



Caractérisation structurale de la régulation de l'ubiquitine-hydrolase AMSH

Emilie Poudevigne

► To cite this version:

Emilie Poudevigne. Caractérisation structurale de la régulation de l'ubiquitine-hydrolase AMSH. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV041 . tel-01067706

HAL Id: tel-01067706

<https://theses.hal.science/tel-01067706>

Submitted on 23 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biochimie et Biologie Structurale**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Emilie Poudevigne

Thèse dirigée par **Winfried Weissenhorn**

préparée au sein de l'Unité Interactions Virus - Cellules Hôte
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Caractérisation structurale de la régulation de l'ubiquitine- hydrolase AMSH

Thèse soutenue publiquement le **24 septembre 2013**,
devant le jury composé de :

Marc Jamin

Directeur de recherche, Grenoble (Examinateur)

F. Xavier Gomis-Rüth

Directeur de recherche, Barcelone (Rapporteur)

Olivier Walker

Maître de conférence, Lyon (Rapporteur)

Marie-Odile Fauvarque

Directeur de recherche, Grenoble (Examinateur)

Rosine Haguenauer-Tsapis

Directeur de recherche, Paris (Examinateur)

Winfried Weissenhorn

Directeur de recherche, Grenoble (Membre)



Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury : Dr. Olivier Walker, Pr. Xavier Gomis-Rüth, Dr. Marie-Odile Fauvarque, Dr. Rosine Haguenauer-Tsapis et Pr. Marc Jamin pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je voudrais aussi remercier les membres de mon comité de suivi de thèse Dr. Marie-Odile Fauvarque et Dr. Carlo Pétosa pour leurs très bons conseils et leurs encouragements.

Merci au Pr. Winfried Weissenhorn qui m'a permis dès le M2 d'intégrer son équipe et d'évoluer tout au long de ces quatre années.

Je voudrais aussi remercier toute l'équipe du Dr. Marie-Odile Fauvarque qui m'a accueillie lors des expériences de mesure de fluorescence et plus particulièrement Anne-Claire pour notre travail en collaboration et nos discussions et Caroline pour son aide précieuse.

Je remercie aussi Pauline, qui m'a soutenue, aidée, encouragée, guidée, écoutée, conseillée... Bref, merci Paulinette ! Et merci aussi à tous mes collègues de l'équipe présente ou passée : Nono, Miriam, Nick, Géraldine, David, Martinellours, Patricia, Christophe, Jens et Aurélien, pour toutes ces discussions et ce partage.

Merci aussi à tous ceux qui ont contribué à faire de ces quatre années un bon moment : Nico, Léandro, Hélène, Eric, Ivan, Alex, Charlotte, Pierre-Alain, Audrey et les thésards du dessus...

Je n'oublie pas Pierre, Sandrine et Elena sans qui tout serait bien plus compliqué, merci !

Un grand merci à Alex qui est présent au quotidien. Conseiller et ami c'est un boulot à plein temps !

Merci à toi Ludo, pour ta patience, ton écoute, ton humour, merci pour l'équilibre que tu as su m'apporter pendant ces trois ans et merci pour ton amour.

Enfin, je voudrais remercier tout particulièrement mes parents, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui et qui ont su me guider, me soutenir et m'accompagner depuis un bon moment déjà... Mille mercis pour tout !

Table des matières

Introduction	13
I. Description générale des mécanismes impliquant le bourgeonnement d'une membrane depuis le cytoplasme	15
<i>I.1 La voie endo-lysosomale</i>	15
<i>I.2 La cytokinèse</i>	16
<i>I.3 L'autophagie</i>	17
<i>I.4 Le bourgeonnement viral</i>	18
I.4.1 Mécanisme dépendant du système ESCRT : exemple du VIH	18
I.4.2 importance de l'ubiquitine dans ce mécanisme	33
II. Les protéines ESCRT	33
<i>II.1 ESCRT-0</i>	33
<i>II.2 ESCRT-I</i>	34
<i>II.3 ESCRT-II</i>	35
<i>II.4 ESCRT-III</i>	36
<i>II.5 VPS4</i>	37
<i>II.6 Les interactions des domaines MIT/MIM</i>	38
<i>II.7 Alix</i>	39
<i>II.8 Implication dans les mécanismes cellulaires</i>	40
III. L'ubiquitine et ses enzymes associées	41
<i>III.1 L'ubiquitine</i>	41
<i>III.2 Les chaînes de polyubiquitine</i>	43
<i>III.3 Les ubiquitine-ligases</i>	45
<i>III.4 Les ubiquitine-hydrolases</i>	46
III.4.1 Informations générales	46
III.4.2 Les ubiquitine-hydrolases impliquées dans les mécanismes en relation avec le système ESCRT	49
<i>III.4.2.1 AMSH</i>	49
<i>III.4.2.2 AMSH-LP</i>	52
<i>III.4.2.3 UBPY</i>	53
Matériel et Méthodes	57
I. Biologie moléculaire et biochimie des protéines	59
I.1 Clonage, expression et purification des différentes constructions d'AMSH	59

I.1.1 AMSH FI, AMSH D348A, AMSH link5 et AMSH EKE	59
I.1.2 Méthylation des lysines d'AMSH FI	60
I.1.3 AMSH 206	60
I.1.4 Mutagénèse dirigée d'AMSH 146 (1-146)	61
I.1.5 His-AMSH 146 (1-146) sauvage , K88A, E104A ou K107A	61
I.1.6 AMSH C-ter (235-424)	61
I.2 Clonage, expression et purification des différentes constructions des CHMP	63
I.2.1 CHMP1A C-ter (123-196) et CHMP1B C-ter (126-199)	63
I.2.2 CHMP3 FI	63
I.3 Clonage, expression et purification des différentes constructions de STAM	64
I.3.1 STAM1 SH3 et STAM2 V.U.S.	64
I.3.2 STAM2 UIM-SH3	64
I.4 Expression et purification d'UBPY N-ter (8-138)	65
II. Méthodes de caractérisation structurale des protéines	66
II.1 Cristallologénèse et introduction à la cristallographie	66
II.1.1 Principe	66
II.1.2 Techniques utilisées	67
II.1.3 Conditions expérimentales	67
II.2 Diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)	68
II.2.1 Principe	68
II.2.2 Conditions expérimentales	68
II.2.3 Traitement et analyse des données	69
III. Etudes des interactions inter-protéiques	70
III.1 Co-purification et co-précipitation	70
III.1.1 Co-purification AMSH FI/ CHMP3 FI	70
III.1.2 Co-précipitation	70
III.2 Résonance plasmonique de surface (SPR)	70
III.2.1 Principe	70
III.2.2 Conditions expérimentales	72
III.2.3 Traitement et analyse des données	73
IV. Etude de l'activité enzymatique d'AMSH	73
IV.1 Etude par gel SDS-PAGE	73
IV.1.1 Production de la di-ubiquitine liée par la lysine K63	73
IV.1.2 Conditions expérimentales	74
IV.1.3 Traitement et analyse des intensités de bandes: ImageJ	74

IV.2 Analyse par mesure de fluorescence	74
Résultats	75
I. Etude de l'interaction entre AMSH ou UBPY et les protéines CHMP	77
I.1 Interactions entre AMSH et les protéines CHMP	77
I.1.1 AMSH 146 sauvage ou 146 muté et CHMP3	78
I.1.1.1 Purifications	78
I.1.1.2. Co-précipitation	79
I.1.2 AMSH Fl et CHMP3 Fl : Co-purification et co-cristallisation	80
I.1.3 Etude de l'interaction entre AMSH et CHMP1A ou CHMP1B	82
I.1.3.1 Purifications	82
I.1.3.2 Mesure des résonances plasmoniques de surface entre MBP-AMSH Nter206 et GST-CHMP1A C-ter ou GST-CHMP1B C-ter (SPR)	84
I.1.3.3 Co-précipitation	86
I.2. Interactions entre UBPY et les protéines CHMP	87
I.2.1 Essais de co-purification	88
I.2.2 Co-précipitation	90
I.2.3 Résonance plasmonique de surface	91
II. Etude de l'interaction entre AMSH et STAM et ses conséquences sur l'activité enzymatique de l'ubiquitine-hydrolase.	92
II.1 Interaction entre AMSH Fl et la sous-unité STAM d'ESCRT-0	92
II.1.1 Purifications	92
II.1.2. Résonance plasmonique de surface	94
II.2 Etude des conséquences des différents domaines de STAM sur l'activation de l'activité enzymatique d'AMSH	98
II.2 .1 Première approche : observation de la réaction enzymatique à t=30 minutes	99
II.2.2 Tests de dé-ubiquitination et interprétation par la méthode SDS-PAGE	100
II.2.3 Tests de dé-ubiquitination et interprétation par mesure de fluorescence	102
II.2.4 Comparaison des résultats obtenus en fluorescence et en gel SDS-PAGE	107
III. AMSH Fl : de la purification à la caractérisation structurale.	109
III.1. Optimisation du protocole de purification d'AMSH via l'étude de différentes constructions	109
III.1.1. AMSH link5 et AMSH D348A	109
III.1.2. AMSH Fl	114
III.1.3. AMSH EKE et AMSH Fl lys met	117
III.1.4. AMSH BrFl : à la recherche d'un homologue d'AMSH Fl	120
III.2. Etude de diffusion de rayons X aux petits angles	123

Discussion et perspectives	129
I. Interaction d'AMSH et UBPY avec les protéines CHMP	131
I.1 AMSH et CHMP3	131
I.2 AMSH et CHMP1A/1B	132
I.3 UBPY et CHMP1B	134
II. Interaction d'AMSH avec STAM2 et ses conséquences sur l'activité enzymatique d'AMSH	135
II.1 Interaction entre AMSH et les domaines VHS, UIM et SH3 de STAM	135
II.2 L'activité enzymatique d'AMSH est activée par STAM	136
III. Analyse structurale d'AMSH	137
Références	141
Annexes	159

Abréviations

AAA ATPase : ATPase associated with a variety of cellular activities

ABC : borane-dimethylamine complex

ADP/ATP : Adénosine Di/ Tri Phosphate

AHT : anhydrotetracycline

ALIX : ALG-2-interacting protein X

AMSH : Associated Molecule of the SH3 domain of STAM

AMSH-LP : AMSH-Like Protein

ARN : acide ribonucléique

BrFl : Branchiostoma Floridae

CA : protéine Capside

CEP55 : Centrosomal Protein of 55 kDa

CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

CHMP : Charged Multivesicular Body Protein

C-ter : extrémité carboxy-terminale

DLS : Dynamic Light Scattering

D.O₆₀₀ : Densité Optique mesurée à 600 nm

Dmax : Diamètre maximum

DTT : dithiothréitol

DUB : Dé-Ubiquitinase

(D)UIM : (Double) Ubiquitin Interaction Motif

E1 : enzyme activatrice de l'ubiquitine

E2 : enzyme de conjugaison de l'ubiquitine

E3 : Ubiquitine-ligase

E72A, K88A, E104A, K107A : Mutation des résidus E72, K88, E104 ou K107 en Alanine

EDC : 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

EGF (R): Epidermal growth factor (Receptor)

EKE : Résidus E175, K176 et E177 mutés en alanine

ERAD : Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation

ESCRT : Endosomal Sorting Complexes Required for Transport

F : fluorophore

Fl : Full length, protéine entière

FT : Flow through, non retenu par la résine

FYVE : Fab1, YGL023, VPS27 and EEA1

GAT : GGA and Tom1

GGA : Golgi-localized, Gamma-adaptin ear-containing, ARF-binding

GLUE : GRAM-Like Ubiquitin in EAP45

GST : glutathion-S-transférase

HRS : Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate

I : Intensité de diffusion

ILV : Intralumenal Vesicles

IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

IST1 : Increased Sodium Tolerance-1

JAMM : Jab1/Mov34/Mpr1 Pad1 N-terminal+

K48, K63 poly-ubiquitine : chaînes d'ubiquitine liées par leur lysine 48 ou 63

k_a : Constante d'association

K_{cat} : Constante catalytique

K_D : Constante d'affinité

K_m : Constante de Michaelis

k_{on} : Constante de dissociation

LB : Luria Broth

lys met : AMSH dont les lysines sont méthylées

MA : Protéine Matrice

MBP : Maltose Binding Protein

MIM : MIT- interacting motif

MIT : Microtubule-Interacting and transport

MVB : Multivesicular Body

NC : Nucléoprotéine

NEDD : Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein

NHS : N-Hydroxysuccinimide

N-ter : extrémité amino-terminale

NZF : Npl4-type Zinc Finger

P(r) : Fonction de distribution des distances

PAS : structure pré-autophagosomale

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDB : Protein Data Bank

PEG : Poly Ethylène Glycol

PI(3)P : phosphatidyl-inositol-3-phosphate

Q : vecteur de diffusion

Q : quencher, molécule inhibitrice du signal fluorescent

R_g : Rayon de giration

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RU : unité de réponse

S75/ S200 : colonne de filtration sur gel Superdex 75/200 (GE Healthcare)

SAXS : Small Angles X-ray Scattering, diffusion de rayons X aux petits angles

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SH3 : SRC Homology 3 Domain

SP1 : Spacer protein 1

SPR : Surface Plasmon Resonance, résonances plasmoniques de surface

STAM : Signal transducing adaptor molecule

TEV : Tobacco Etch Virus

TOM1 : Target of Myb1

TSG101 : Tumor susceptibility gene 101

Ub : Ubiquitin

UBAP1 : Ubiquitin Associated Protein 1

UBD : Ubiquitin binding domain

UBPY : Ubiquitin isopeptidase Y

UEV : Ubiquitin E2 Variant

USP : Ubiquitin-specific-processing

VUS : domaines VHS-UIM-SH3 de STAM

VHS : VPS27, HRS and STAM

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VPS : Vacuolar Protein Sorting

Introduction

I. Description générale des mécanismes impliquant le bourgeonnement d'une membrane depuis le cytoplasme

I.1 La voie endo-lysosomale

La voie endo-lysosomale permet la dégradation ou le recyclage des récepteurs membranaires comme le récepteur à l'hormone de croissance épithéliale (EGFR) ou le récepteur au facteur de croissance des hépatocyte (HGFR) (Gorden et al., 1978) (Haigler et al., 1979). En effet, lorsque ceux-ci doivent être dégradés afin d'interrompre la cascade de signalisation, ils sont alors ubiquitinés par plusieurs mono-ubiquitination ou par des chaînes d'ubiquitines liées par leur lysine K63 (Piper and Lehner, 2011). Ils sont ensuite dirigés vers les endosomes grâce à la formation d'une vésicule par endocytose puis, cette vésicule fusionnera avec la membrane des endosomes précoces et, grâce au système ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), de nouvelles vésicules, appelées vésicules intraluminales (ILV) seront formées à l'intérieur de ces organelles qui deviendront alors des corps multi-vésiculaires (MVB) ou endosomes tardifs. A cette étape, les récepteurs à dégrader seront incorporés dans les MVB par les ILV alors que ceux à recycler seront renvoyés à la membrane. C'est dans ce contexte que nous expliquerons le fonctionnement des protéines du système ESCRT dans le chapitre I-2. Finalement, les MVB fusionneront avec les lysosomes, la membrane des ILV sera dégradée par des lipases et leur contenu sera relargué dans le lumen des lysosomes et dégradé par des protéases. Cette voie permet aussi le transport de récepteur lysosomaux de la membrane plasmique vers la membrane lysosomale (Gruenberg and Stenmark, 2004) (Katzmann et al., 2002) (figure 1).

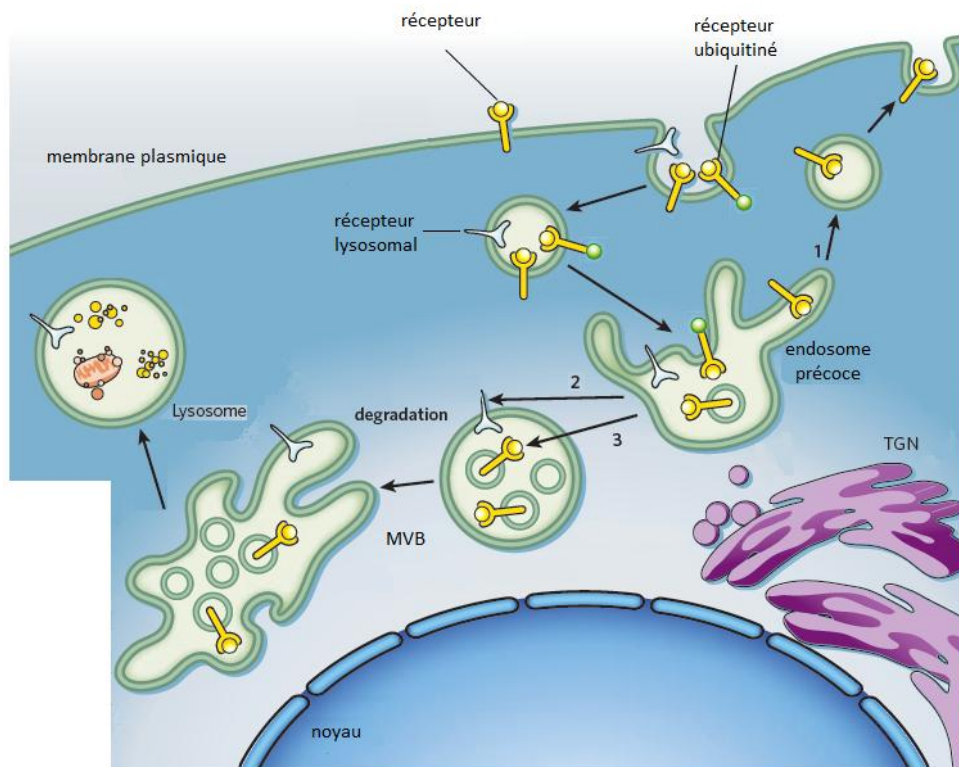


Figure 1 : Illustration de la voie endo-lysosomale. MVB (Multivesicular Body), Sphères vertes : Ubiquitine. Figure adaptée de (Raiborg and Stenmark, 2009).

1.2 La cytokinèse

La cytokinèse est la séparation de deux cellules filles à partir d'une cellule en division. Cet événement se produit à la fin de la mitose lorsque les chromosomes ont été répartis à chaque pôle. La première étape est la formation d'un anneau d'actine et de myosine qui contraint la membrane plasmique et forme un sillon qui séparera la cellule mère en deux. A ce stade, les deux cellules filles sont encore connectées par un pont intercellulaire qui contient des faisceaux antiparallèles de microtubules. La région où les faisceaux se chevauchent est appelée le corps intermédiaire (Barr and Gruneberg, 2007) (Pollard, 2010). La deuxième étape est l'abscission, qui correspond à la fission de la membrane plasmique (figure 2). Elle nécessite l'implication des protéines du complexe ESCRT-III, de VPS4, d'Alix, d'IST1 et de TSG101 et dure environ 20 minutes pour des cellules humaines (Carlton and Martin-Serrano, 2007) (Morita et al., 2007a) (Morita et al., 2010) (Agromayor et al., 2009) (Bajorek et al., 2009a).

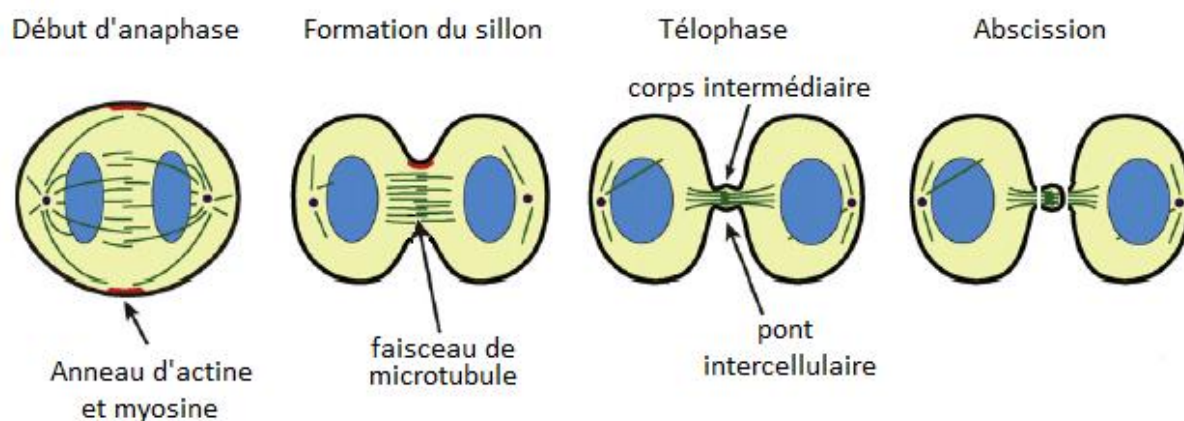


Figure 2 : Différentes étapes de la cytokinèse. En rouge : Anneau d'actine et myosine, en vert : microtubules. Figure adaptée de Guizetti and Gerlich, 2010.

Durant l'abscission toutes les sous-unités du complexe ESCRT-III, les protéines CHMP (charged multivesicular body protein), sont recrutées séquentiellement au pont intercellulaire et au corps intermédiaire. Lorsqu'une de ces protéines est déletée, l'abscission est altérée (Morita et al., 2010). L'interaction d'Alix et TSG101 avec la protéine impliquée dans la cytokinèse : Cep55, permet leur recrutement au corps intermédiaire. Des études de microscopie à illumination structurée ont montré qu'Alix et Cep55 se situent au centre du corps intermédiaire alors que TSG101 se retrouve de part et d'autre de celui-ci (Elia et al., 2011). Les protéines CHMP4B, 6 et 2A sont elle aussi recrutées, probablement par TSG101, de part et d'autre du corps intermédiaire. Les autres protéines CHMP, notamment CHMP3, seront à leur tour recrutées afin de réaliser la scission de la membrane de chaque côté du corps intermédiaire (Guizetti et al., 2011). Les deux cellules filles sont alors séparées (Lafaurie-Janvore et al., 2013).

I.3 L'autophagie

L'autophagie est un mécanisme qui permet initialement d'englober une partie du cytosol d'une cellule et de recycler ses composants afin de subvenir, en cas de manque ; aux besoins en éléments précurseurs de la biosynthèse (Nakatogawa et al., 2009). Cependant, ce procédé est aussi impliqué dans la dégradation de protéines cytosoliques mal repliées, d'organelles détériorées ou de pathogènes, dans la régulation de la mort cellulaire et a un rôle important dans des maladies comme les cancers ou la neurodégénérescence. En effet, dans le dernier cas, si l'autophagie n'est pas fonctionnelle, les protéines mal repliées et les organelles détériorées ne sont plus éliminées ce qui peut entraîner des syndromes d'Huntington ou de Parkinson (Son et al., 2012) (Lee et al., 2013). Ce mécanisme est initié par le manque de nutriments ou des signaux hormonaux et débute par la formation d'une structure pré-autophagosomale (PAS). Ensuite, une membrane isolante est créée : le phagophore (Hamasaki et al., 2013). Celui-ci s'allonge jusqu'à se refermer et engouffrer une partie du cytosol. Cette nouvelle structure, appelée autophagosome, fusionnera avec le lysosome afin d'y relarguer son contenu qui sera ainsi dégradé (Reggiori and Klionsky, 2002) (figure 3). L'implication des protéines ESCRT dans ce système a été découverte plus récemment grâce à des observations de microscopie électronique : l'inhibition ou la délétion des membres de cette machinerie entraîne une accumulation d'autophagosomes (Rusten and Stenmark, 2009) (Rusten et al., 2007). Cependant, il n'est pas encore clair si celles-ci ont un rôle direct ou indirect. En effet, le système ESCRT pourrait réaliser directement la fermeture du phagophore en autophagosome car ce mécanisme a une topologie similaire à la formation des ILV dans la voie endo-lysosomale. Mais il est aussi possible qu'en l'absence des ESCRT, les MVB ne soient plus formés et que cela impacte indirectement la voie de l'autophagie (Rusten and Stenmark, 2009).

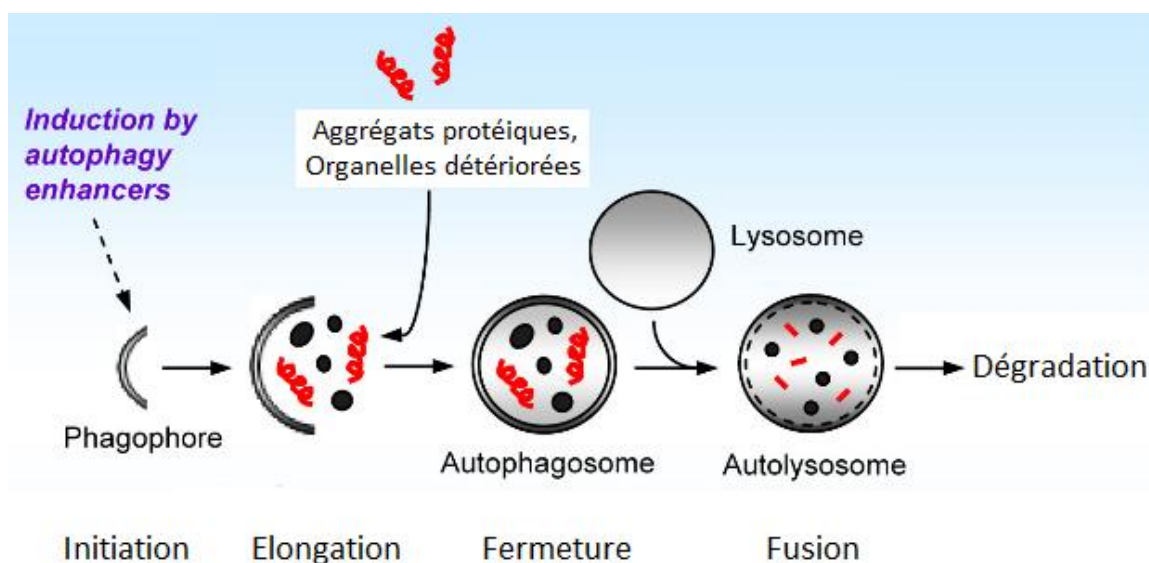


Figure 3 : Mécanisme d'autophagie. Figure adaptée de Sarkar et al., 2008.

I.4 Le bourgeonnement viral

I.4.1 Mécanisme dépendant du système ESCRT : exemple du VIH

Le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), découvert au début des années 80, appartient à la famille des rétrovirus et au genre des lentivirus (Barré-Sinoussi et al., 1983). Il possède un génome d'ARN simple brin encapsidé avec les enzymes nécessaires à la réplication du virus à l'intérieur d'une structure lipoprotéique qui forme le virion. Au sein d'une cellule infectée, le bourgeonnement viral, situé à la membrane plasmique, permet le relargage de nouveaux virions infectieux (Jouvenet et al., 2006) (Finzi et al., 2007). Ce procédé nécessite des protéines virales mais aussi des protéines de la cellule hôte et notamment les protéines de la machinerie ESCRT (Gheysen et al., 1989) (Martin-Serrano and Neil, 2011). Revenons tout d'abord sur l'ARN génomique. Celui-ci code pour la polyprotéine Gag qui est divisée en plusieurs domaines (figure 4) :

- le domaine matrice ou MA, qui est impliqué dans l'adressage et la liaison de Gag à la membrane (Saad et al., 2006) (Perez-Caballero et al., 2004) (Gottlinger et al., 1989) (Zhou et al., 1994)
- le domaine capside ou CA, qui permet l'oligomérisation de Gag et la formation de la capside (Briggs et al., 2009) (Wright et al., 2007)
- le domaine de la nucléoprotéine ou NC, qui incorpore l'ARN dans la capside et contribue à la polymérisation de Gag (Muriaux and Darlix, 2010)
- le domaine p6, qui contient les domaines tardifs chargés de recruter les partenaires de la cellule hôte (Morita and Sundquist, 2004)
- le domaine SP1, qui relie CA et NC et le domaine SP2, qui relie NC et p6

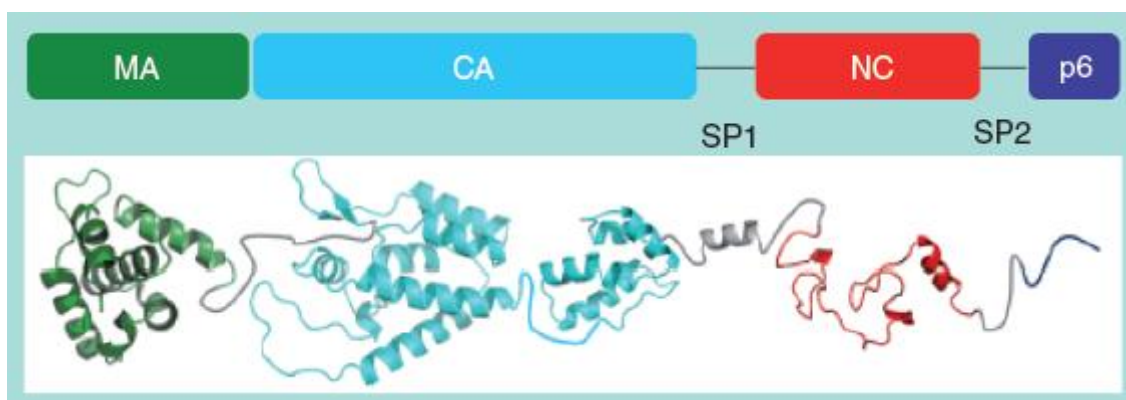


Figure 4 : Polyprotéine Gag représentée sous forme schématique et modélisée grâce aux structures connues des différents domaines. MA : matrice, CA : capside, NC : nucléoprotéine, SP : peptide d'espacement. (Dordor et al., 2011)

Après l'action successive des domaines MA, CA et NC, p6 recrute des facteurs de la cellule hôte afin de terminer le bourgeonnement, c'est-à-dire de réaliser la scission membranaire. Ce recrutement se fait via l'interaction entre les domaines tardifs P(T/S)AP ou LYPX_nL de p6 et respectivement TSG101 ou ALIX (Garrus et al., 2001) (Martin-Serrano et al., 2001) (VerPlank et al., 2001) (Martin-Serrano et al., 2003) (Strack et al., 2003) (Vincent et al., 2003). Il semblerait que TSG101 et ALIX recrutent ensuite directement les protéines du complexe ESCRT-III mais ce qui se substitue à ESCRT-II n'a pas encore été déterminé. En effet, CHMP6 pourrait être un intermédiaire liant à la fois ESCRT-I et les autres protéines d'ESCRT-III mais il a été montré que sa délétion n'empêche pas le virus de bourgeonner (Langelier et al., 2006) (Pineda-Molina et al., 2006). Des études d'imagerie de cellules vivantes ont montré que CHMP4B, CHMP4C, CHMP1B et VPS4B étaient recrutés au site de bourgeonnement de façon transitoire (Jouvenet et al., 2011). D'autres études de déplétion des gènes codant pour les protéines CHMP ont permis de démontrer qu'une co-déplétion de CHMP2 et CHMP4 ou de CHMP2A et CHMP3 inhibait le bourgeonnement viral mais que la déplétion de CHMP3 seule ou CHMP1 n'avait qu'un faible impact et que la déplétion des autres protéines CHMP n'avait aucun effet (Morita et al., 2011) (Effantin et al., 2013a). Nous pouvons donc conclure de ces différentes études que les protéines CHMP ne sont pas toutes recrutées lors de la fission membranaire et du bourgeonnement du VIH et que les membres les plus importants, responsables de la fission, sont CHMP4, CHMP2B et le complexe CHMP2A/CHMP3. Un modèle global du bourgeonnement viral nécessitant le système ESCRT a pu être construit grâce à toutes ces informations et est représenté dans la figure 5. La revue « Essential and supporting host cell factors for HIV-1 budding », publiée en 2011 dans le journal *Future Microbiology* par notre groupe (Dordor et al., 2011), regroupe ces informations et décrit plus en détail ce processus.

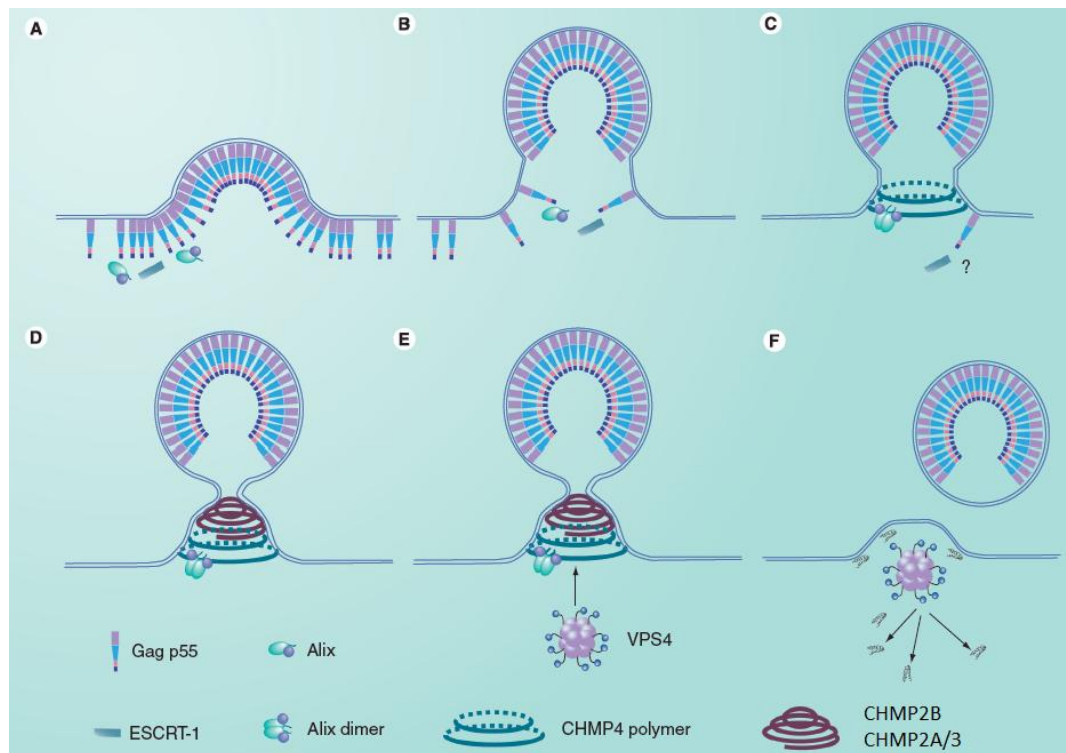


Figure 5 : Modèle de bourgeonnement du VIH. (Dordor et al., 2011)

Beaucoup de virus enveloppés avec un génome d'ARN simple brin utilisent le système décrit précédemment pour former les nouveaux virions et se détacher de la cellule infectée, et notamment tous ceux de la famille des rétrovirus comme le VIH (Martin-Serrano and Neil, 2011) (Morita and Sundquist, 2004). Les familles des Rhabdovirus, des Filovirus, des Arenavirus et certains membres de la famille des Paramyxovirus (Nipah, virus de la rougeole, virus respiratoire syncytial), utilisent aussi le système ESCRT pour la fission membranaire et le bourgeonnement. Tous recrutent ces protéines grâce à différents domaines tardifs situés sur les protéines virales qui interagissent avec les membres de la machinerie ESCRT : TSG101, ALIX et l'ubiquitine-ligase Nedd4. Toutefois, certaines de ces interactions n'ont pas encore été élucidées (Hartlieb and Weissenhorn, 2006) (Dolnik et al., 2008) (Okumura and Harty, 2011) (Liu and Harty, 2010). Hormis les virus cités ci-dessus, d'autres ont développé un système de fission membranaire et/ou de bourgeonnement indépendant du système ESCRT et ces mécanismes sont décrits dans la revue que nous avons publié en 2013 dans le journal *Current Opinion in Virology* intitulée « How to get out: ssRNA enveloped viruses and membrane fission » et présentée en annexe.

Essential and supporting host cell factors for HIV-1 budding

Aurelien Dordor¹, Emilie Poudevigne¹, Heinrich Göttinger²
& Winfried Weissenhorn^{1*}

¹Unit of Virus Host Cell Interactions UMI 3265 Université Joseph Fourier-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz 38042 Grenoble Cedex 9, France

²Program in Gene Function & Expression, Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

*Author for correspondence: Tel.: +33 476 207 281; Fax: +33 476 209 400; weissenhorn@embl.fr

HIV-1 employs its structural proteins to orchestrate assembly and budding at the plasma membrane of host cells. The Gag polypeptide is sufficient to form virus-like particles in the absence of other viral proteins and provides a platform to interact with numerous cellular factors that regulate Gag trafficking to the site of assembly and budding. Notably endosomal sorting complexes required for transport have attained much attention over the last decade because of their essential role in virion release. Here we review recent advances in understanding the role of host cell factors recruited by Gag during HIV-1 assembly and budding.

The role of viral structural proteins in HIV-1 assembly

HIV-1 assembly and budding take place at the plasma membrane [1–3] and require the interplay of viral structural proteins [4] and cellular factors to successfully release new infectious virions [5–9]. Although budding is mostly driven by the polypeptide Gag (Figure 1), which is sufficient to produce virus-like particles (VLPs) [10], the production of infectious virions additionally requires Env, genomic RNA and Gag-Pol, which encodes protease, reverse transcriptase and integrase [11]. The Gag polypeptide or Gag-RNA aggregates/polymers initiate assembly at the plasma membrane mediated by membrane interaction of the matrix (MA) domain. Both myristylation of the N-terminal glycine of MA and MA's basic surface patch are required for Gag plasma membrane targeting [12–14]. Membrane targeting specificity is determined by MA recognition of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) [15], which contributes together with Gag multimerization [16,17] to the exposure and plasma membrane insertion of the MA myristate group [18,19].

In the immature virion, Gag forms an extended structure [20]. MA is followed by the second structural moiety encoded by Gag, the capsid domain (CA). CA is composed of N-terminal domain and C-terminal domain (Figure 1). CA-C-terminal domain mediates multiple weak and cooperative Gag-Gag interactions, which are further supported by the adjacent SP1 [4,21,22]. CA is majorly responsible for the continuous, but incomplete hexameric Gag lattice [21,23,24]. Although MA and the third structural domain of Gag, the nucleocapsid protein (NC) do not follow hexagonal symmetry, MA can form hexamers on membranes [25].

The capsid domain CA is followed by NC (Figure 1) whose main function is the incorporation of two RNA genomes [26] a process that contributes to Gag polymerization [27]. However, only a small number of Gag molecules recruit viral genomes to the plasma membrane [2]. Gag polymers in complex with genomic RNA are already present in the cytosol and are as such targeted to membranes [28]. Finally the last domain of Gag, p6 connected via SP2 to NC, functions as a hub for cellular factors required for budding (Figure 1) [5].

The Gag lattice assembled at budding sites is indistinguishable from that of immature virions [29]. The transition from the Gag lattice of immature virions [21] to mature virions [30] is mediated by the protease that cleaves Gag during assembly; PR activity produces MA, CA, SP1, NC, SP2 and p6 proteins. MA stays associated with the inner viral membrane upon PR cleavage while CA forms a cone-shaped core around the condensed ribonucleoprotein composed of NC and the viral RNA genomes [4,31,32]. Importantly, PR cleavage of Gag is essential to produce infectious virions [33,34].

Host cell factors involved in Gag trafficking

How is Gag directed to the site of assembly? Although we still lack a comprehensive picture, multiple factors have been identified to affect assembly and budding by influencing Gag trafficking (Table 1) [35]. Gag assembly depends on the pathway of REV-mediated Gag mRNA export from the nucleus to direct Gag to productive assembly sites [36,37]. The suppressor of cytokine signaling-1 is an inducible host factor

Keywords

• budding • CHMP2 • CHMP3
• CHMP4 • CHMP6 • ESCRT-I
• ESCRT-III • Gag • HIV-1
• L domain • membrane
fission • VPS4

future medicine part of fsg

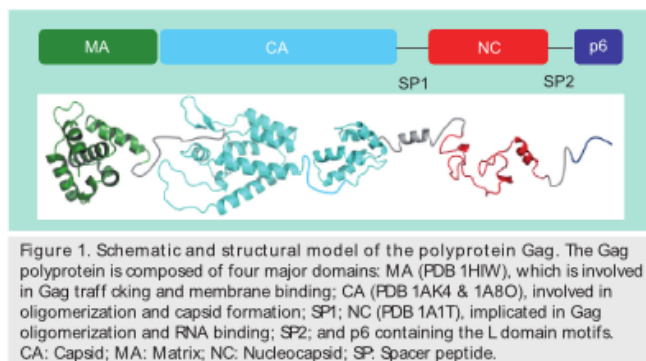


Figure 1. Schematic and structural model of the polyprotein Gag. The Gag polyprotein is composed of four major domains: MA (PDB 1HIW), which is involved in Gag trafficking and membrane binding; CA (PDB 1AK4 & 1A8O), involved in oligomerization and capsid formation; SP1; NC (PDB 1A1T), implicated in Gag oligomerization and RNA binding; SP2; and p6 containing the L domain motifs. CA: Capsid; MA: Matrix; NC: Nucleocapsid; SP: Spacer peptide.

that regulates Gag trafficking via interaction with MA and NC; its absence induces perinuclear Gag aggregation and degradation [38]. Plasma membrane trafficking defects are also observed in the absence or during overexpression of Golgi-localized, γ -ear containing, ADP-ribosylation factor-binding proteins by disrupting the function of endogenous ADP-ribosylation factors [39,40]. Clathrin adaptor complexes AP-1, -2 and -3 play an additional role in Gag trafficking [41–43] consistent with clathrin incorporation into virions, which is important for optimal replication [44,45]. Gag transport seems to further depend on intact cellular trafficking, including the SNARE machinery [46], endosomal trafficking [47], and flamin A [48]. Furthermore, actin interacts with NC, and actin filaments are transiently assembled during budding [49].

Additionally, HIV-1 Gag trafficking might display some cell-type specificity. Although HIV-1 buds from the plasma membrane in most target cells, budding in macrophages was suggested to occur in endosomal or nonclassical endosomal compartments [50–53]. This observation is supported by the Annexin 2–Gag interaction at the limiting membrane of late endosomes or multivesicular bodies [54,55]. However, the role of endosomes in budding might have to be reconsidered because budding in macrophages was also observed at the plasma membrane [1,56], from an internally sequestered plasma membrane [57] and from tubular membranous compartments that are continuous with plasma membrane [58,59].

Together these data suggest that trafficking of Gag to the site of assembly at the plasma membrane must be orchestrated to ensure the necessary Gag concentration required to form the Gag protein lattice and initiate virion production. Although only the viral structural proteins assemble into the virion as described earlier, the

virus requires important assistance from the cell to bud off. This help is recruited from specific domains whose function is described below.

Late domains recruit endosomal sorting complexes required for transport. HIV-1 budding depends on the N-terminal region of p6 [60], because mutations within a conserved p6 sequence motif inhibit budding at a late stage [60,61]. Since then, three different so-called late domains (L domains) have been identified and shown to be functionally interchangeable [62–64]. The two L domains relevant for HIV-1 have the sequence motifs P(T/S)AP and LYPX_nL [5,9,65,66], while the third L domain PPXY is important for release of other enveloped viruses [67,68].

A huge body of work has shown that L domains engage the vacuolar protein sorting (VPS) machinery, composed of endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT)-0, -I, -II, -III and the VPS4 complex, that catalyzes plasma membrane receptor downregulation at endosomal membranes [69,70] as well as distinct steps during cell division [6,71–74]. L domains are employed to recruit ESCRTs; the PTAP motif binds to Tsg101 a member of ESCRT-I [75–77] and LYPX_nL recruits Alix which might link ESCRT-I and ESCRT-III [78–81]. The third class, PPXY, interacts with WW domains present in HECT domain-containing E3 ubiquitin ligases, such as Nedd4 [82–84].

The PTAP Tsg101 binding motif is essential for HIV-1 replication [75] while siRNA knock-downs of Alix or deletion of the Alix-specific L domain have more modest effects on virion production and HIV-1 replication [80,85,86]. An important question thus concerns the roles of the different cellular factors recruited during assembly and budding. We will describe in the following two sections cellular interactions that can be considered to be supportive but nonessential and those which are absolutely essential for budding.

Factors supporting HIV-1 budding

A number of cellular factors linked to the ESCRT system have been shown to play roles in HIV-1 budding, although they seem to be nonessential in various cell culture systems employed to study HIV-1 budding. Among these factors Alix is the most studied but its exact role in HIV-1 budding is still unclear.

Alix is composed of three domains, an N-terminal Bro1 domain that interacts with the C-terminal region of all ESCRT-III CHMP4

isoforms [87]; Bro1 connects to a V-shaped domain that harbors the late domain binding site [85,88,89], which is followed by a proline-rich region that serves as a hub for multiple cellular factors [8,90]. The PRD seems to keep Alix in an autoinhibitory state [91,92], while deletion of the PRD induces Alix dimerization [85,93].

Alix clearly has a supportive role in HIV-1 budding [78,79,88] and overexpression of isolated Alix domains inhibit HIV-1 release [94]. Notably, cells overexpressing Alix can compensate for the loss of the Tsg101-specific L domain, which depends on the CHMP4 binding site present in the Bro1 domain [85,95]. Furthermore, the role of Alix seems to be cell-type specific, because the requirement of Alix-support for HIV-1 replication varies substantially between different target cells of HIV-1 [86]. Finally, Alix function during HIV-1 budding depends on its propensity to dimerize and/or multimerize [93,96].

Alix Bro1 also interacts with the zinc fingers of NC and elimination of the interaction interface inhibits HIV-1 budding. Notably HIV-1 zinc

finger mutants were defective for particle production and exhibited a similar defect in Gag processing as a PTAP deletion mutant [97–99]. Markedly, the NC-P1 region of Gag plays an important role in the ESCRT-pathway dependency of HIV-1 budding [100]. However, because siRNA depletion of Alix has only a moderate effect on HIV-1 budding [80], other Bro1-containing factors might be able to compensate for the function of the Alix Bro1–NC interaction [101].

Recent work has also shed more light on the role of ubiquitin in HIV-1 budding. Virions contain free ubiquitin and small amounts of Gag are ubiquitinated [102], whereas ubiquitination is independent on Gag–membrane interaction [103]. HECT domain-containing ubiquitin ligases, which might ubiquitinate Gag have been linked to HIV-1 budding, even though HIV-1 does not contain the PPxY L domain employed by other viruses to recruit such ligases. Notably overexpression of Nedd4–2, a splice variant of Nedd4–2 (Nedd4L) with a naturally truncated C2 domain, potentially rescues Tsg101-related

Table 1. List of cellular factors that interact with Gag and affect assembly and virion budding.

Gag	Host protein	Function	Ref.
MA	Adaptor protein complex AP-1 (μ subunit)	Interaction with MA as well as Tsg101 and Nedd4–1; positive regulator of budding	[43]
MA	Adaptor protein complex AP-2 (μ 2 subunit)	AP-2 interaction with matrix–capsid junction in the Gag polypeptide (Tyr 132 and val135); regulation of HIV assembly	[42]
MA	Adaptor protein complex AP-3 (d subunit)	Gag trafficking to MVB; role in particle assembly	[41]
MA	SOCS-1	Positive regulator of Gag stability and trafficking	[38]
MA	Calmodulin	Myristoylate group exposure	[147]
CA	CypA	Accelerates protein folding by catalyzing the cis–trans isomerization of proline imidic peptide bonds. Present inside virions, unknown role, may act in capsid restriction	[148]
CA	Filamin A	Positive regulator of assembly	[48]
NC	Alix (Bro domain)	Bro domain alone stimulates virus release; NC cooperates with PTAP L domain in the recruitment of cellular proteins necessary for its L domain activity	[101] [96]
NC	ABCE1	Role in capsid assembly	[149]
NC	F-actin	Assembly and budding are actin driven	[49]
NC	SOCS-1	Positive regulator of Gag stability and trafficking	[38]
P6	Alix (V domain)	Interaction with L domain LYPx(n)L; positive regulator of budding; supportive role of PTAP L domain function	[78–80]
P6	Tsg101 ESCRT-I complex	Interaction with L domain PTAP, essential for HIV-1 budding; recruitment of ESCRTs	[75]
Gag	ADP-ribosylation factor-binding protein (GGA) and ARF	Gag trafficking; positive regulation of assembly and budding	[39]
Gag	Annexin 2	Macrophage-specific assembly factor	[54]
Gag	Dlg-1	Negative regulator of assembly	[150]
Gag	Nedd4	Positive regulator of budding; ESCRT-I independent	[107]
?	Vps18 and Mon2	Gag trafficking	[47]

ABCE1: ATP-binding cassette sub-family E member 1; Alix: ALG-2 interacting protein X; ARF: ADP-ribosylation factor; Anx2: Annexin 2; CA: Capsid; CypA: Cyclophilin A; Dlg-1: Human Disc large; ESCRT: Endosomal sorting complexes required for transport; MA: Matrix; NC: Nucleocapsid; Nedd4: Neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 4; SOCS-1: Suppressor of cytokine signaling 1; Tsg101: Tumor susceptibility gene 101.

budding defects [104,105]. However, direct Gag ubiquitylation is not always necessary, suggesting that the catalytic activity of Hect domain-containing ubiquitin ligases is employed to ubiquitylate factors acting in trans to drive budding [106]. Interestingly, the truncated C2 domain of Nedd4-2 is sufficient to transfer the ability to stimulate HIV-1 budding to other Nedd4 family members [107]. Although the exact role of these ligases at the budding site is yet unclear, they provide a link to the ESCRT pathway [69,108].

The potential role of ubiquitin in budding was indirectly linked to the ubiquitin hydrolase, AMSH that is part of the ESCRT pathway and removes ubiquitin from cargo [109]. AMSH was shown to interact with ESCRT-III proteins including CHMP3 [110,111] and overexpression of catalytically inactive GFP-AMSH converts wild-type CHMP3 into a potent inhibitor of HIV-1 release [111]. By contrast, overexpression of C-terminal-tagged versions of catalytically inactive AMSH and CHMP3 induced only a mild inhibitory effect on budding, indicating that the previously observed budding defect might be caused by unusual deregulation of N-terminally tagged GFP-AMSH [112].

Even though the exact roles of ubiquitin hydrolases have yet to be established, it is interesting to note that ubiquitylation during budding might provide additional support to recruit ESCRTs in cell types with limited expression of Tsg101 [104]. Albeit not shown for HIV-1, Gag-ubiquitin fusions of equine infectious anemia virus Gag eliminate the role of the L domain for VLP release [113], providing further evidence that ubiquitin supports access to the ESCRT machinery.

As well as positive budding signals, Gag contains a negative budding signal within the SP2 domain whose function was linked to the ESCRT machinery [114]. Furthermore, budding might be directly linked to immune defense. Pattern recognition receptors recruit TANK-binding kinase (TBK)-1 that is part of a scaffold that activates the expression of IFN- β as a first line of immune defense during infection. Notably, overexpression of TBK1 attenuates PTAP-dependent HIV-1 budding via the interaction with the ESCRT-I component Vps37C [115].

In summary, the supportive factors might be nonessential in cell culture systems but must play an important role during infection. The Alix binding site in Gag p6 for example could have been easily deleted from viral genomes a long time ago if Alix recruitment did not provide

important advantages for the virus life cycle. Thus, the support provided by Hect domains, ubiquitin, Alix and other factors influencing HIV-1 budding most likely provide essential advantages to spread infection.

Central role of ESCRT-III in HIV-1 budding

HIV-1 recruits only a subset of the ESCRT complexes to the budding site, including ESCRT-I, selected ESCRT-III members and the VPS4 complex, while ESCRT-II and -II are dispensable for budding [116]. As ESCRT-II provides the link between ESCRT-I and -III in yeast via ESCRT-II Vps25 interaction with Vps20 (CHMP6) [117], an open question is how ESCRT-I might be linked to ESCRT-III during HIV-1 budding. Although Alix could provide that link through its interaction with Tsg101 and CHMP4 [78–80], Alix depletion has no substantial effect on HIV-1 budding [80], indicating that another factor must provide the link. One possibility is that VPS28, a component of heterotetrameric ESCRT-I [118] interacts directly with CHMP6 [119], however CHMP6 is also not essential for HIV-1 budding [116].

In addition there might be an indirect role for ESCRT-II; sprouty (Spry2) binds to the ESCRT-II subunit, Eap20, leading to the disruption of the ESCRT-I–II interaction, thus liberating ESCRT-I to serve HIV-1 budding [120]. Intriguingly, Spry is known to bind SIV-1 CA and contributes to TRIM5 α -induced capsid restriction [4].

A huge body of evidence indicates that the different routes to access ESCRTs via Tsg101, Alix or the ubiquitin ligases aim to provide access to ESCRT-III and the VPS4 machinery. The first compelling evidence came from data showing that dominant negative forms of ESCRT-III members and of catalytically inactive VPS4 are potent inhibitors of HIV-1 budding [78–80]. VPS4 is an AAA-type ATPase that exists as an inactive dimeric form in the cytoplasm and as an active dodecameric form [121]; thus overexpression of the catalytically inactive form leads to the assembly of mixed dodecamers that become inactive and therefore unable to fulfill their function to disassemble ESCRT-III from membranes [121–123]. Mammalian cells express 12 ESCRT-III-like proteins. While CHMP3, CHMP6, CHMP4A, B and C and CHMP2A, B isoforms might form a core ESCRT-III complex as suggested for the yeast homologs [124], the other members including CHMP1A, B, CHMP5, CHMP7 and IST1 seem to exert regulatory roles [70,125].

ESCRT-III members shuttle between an inactive autoinhibited state present in the cytosol and an activated state that polymerizes on membranes. Release of autoinhibition entails the displacement of the C-terminal region from the N-terminal helical core of CHMP proteins [111,126–130]. The C-terminal regions of most CHMP proteins contain MIT domain interacting motifs (MIMs) that are employed to recruit VPS4 [131–133]. It is likely that this MIM–MIT interaction with membrane-associated CHMP polymers is required to induce further activation of VPS4, such as dodecamer assembly, which ultimately leads to ESCRT-III recycling [121].

The first direct evidence that CHMP protein polymerization on membranes can deform membranes came from overexpression experiments of CHMP4 and catalytically inactive VPS4, which revealed circular CHMP4 polymers associated with plasma membrane and capable of inducing tubes protruding from the plasma membrane [134]. In vitro experiments also showed polymerization propensities of CHMP proteins. CHMP4 forms loose circular arrays of linear polymers that are most likely formed by head-to-tail interactions of CHMP4 [93,135]. By contrast, CHMP2A and CHMP3 assemble into defined helical tubular structures that are straight, cone-shaped and often closed at one end [129–136]. These tubes expose their membrane-targeting surface on the outside and the VPS4 interaction sites on the inside, permitting VPS4-driven tube disassembly in vitro [136].

The structural features of the CHMP2–3 helical tubes suggest that they could assemble within the membrane neck of budding structures such as virions, vesicles or the cytokinetic midbody [136]. However, the mean tube diameter of CHMP2A-3 tubes is approximately 50 nm, which keeps the membranes too far apart in order to undergo fission. Nonetheless some of the tubes generated in vitro revealed closed ends characterized by a successive narrowing of the helical diameter which resembles ‘dome-like’ structures. Such structures might be able to attract membrane and act as a scaffold for membrane bending. This could then lead to thinning of the membrane neck and spontaneous fast fission [137]. This model leaves the possibility open that VPS4 might play an active role in fission by releasing the elastic stress imposed by the CHMP protein scaffold on the membrane [137]. Besides this model, other possibilities are discussed in the literature, such as stepwise removal of CHMP proteins from membrane-bound polymers that induce constriction and eventually fission [70,138].

The first direct evidence of CHMP proteins catalyzing membrane fission came from in vitro experiments with giant unilamellar vesicles (GUVs). It was shown that the presence of the four core yeast CHMP proteins (Vps20, Snf7, Vps24 and Vps2) leads to vesicle budding into the lumen of GUVs [139]. The requirement for CHMPs was further narrowed down to the fission process itself, because a follow-up study suggested that CHMP4 (Snf7) is sufficient to induce fission and thus the release of vesicles into the GUV lumen. Furthermore, Vps4 did not play an active role in this set-up [140].

In summary, a huge body of work demonstrates that ESCRT-III is part of the membrane fission machinery that is recruited during HIV-1 release. Although there are several potential and promising models, it still needs to be determined experimentally how this complex achieves its task. Furthermore, as described in the next paragraph, the minimal requirements for membrane fission concerning the ESCRT-III composition and role of VPS4 in vitro and in vivo seem to differ and these issues need to be resolved in future experiments.

Dynamic assembly & minimal requirement of ESCRT-III & VPS4 at budding sites

Live cell imaging of budding sites revealed that Gag recruitment into VLPs was completed in 9.6 min on average [141], independent of the presence or absence of L domains [142], indicating that ESCRTs are not required for Gag recruitment and assembly. Together with Gag, Alix progressively accumulated and remained at the site throughout the budding process [142]. Termination of Gag recruitment was then followed by a short (~1–3 min) appearance of GFP-tagged ESCRT proteins CHMP4B, CHMP4C, CHMP1B and VPS4B (tested so far), indicating that the fission machinery assembles late and only transiently at the budding site [142].

Late-domain-dependent recruitment of VPS4A to nascent HIV-1 particles at the host cell plasma membrane was further confirmed and analyzed in more detail by live-cell imaging. Accordingly, VPS4 is recruited transiently to the budding site and assembles into 2–5 dodecamers. The short (~35 s) appearance of VPS4 just before particle release provides the strongest evidence so far for a direct role of VPS4 in membrane fission leading to HIV-1 release [143].

An elegant study by the Sundquist laboratory analyzed the requirement of all ESCRT-III members for HIV-1 budding systematically. Interestingly, they found that virus release was largely inhibited by co-depletion of either CHMP2 or CHMP4 family members. By contrast, depletion of CHMP3 and CHMP1 proteins resulted in only modest titer reductions (two- to eight-fold) and no effect could be observed by depleting cells of other ESCRT-III members [144]. Moreover, the function of CHMP4 and CHMP2 in release depends on their interaction, which was determined biochemically. Furthermore, electron microscopy images of budding sites of CHMP2-depleted cells reveal ring-like electron-dense structures within the membrane neck of some virions that

fail to pinch off. This suggests that these ring-like structures might be composed of CHMP4 polymers that accumulate in the absence of CHMP2 [144]. Notably these images are also the first images that visualize ESCRT-III within the neck of a budding virion.

Together these data demonstrate that CHMP4 recruitment is not sufficient to catalyze membrane fission in the absence of CHMP2. However, CHMP4 polymers are important and likely provide a platform for CHMP2 assembly, which in turn might recruit VPS4 to complete membrane fission. Thus, only a selected subset of ESCRT-III is required for HIV-1 release and VPS4 seems to play an active role in membrane fission and not only disassemble and recycle ESCRT-III components from membranes.

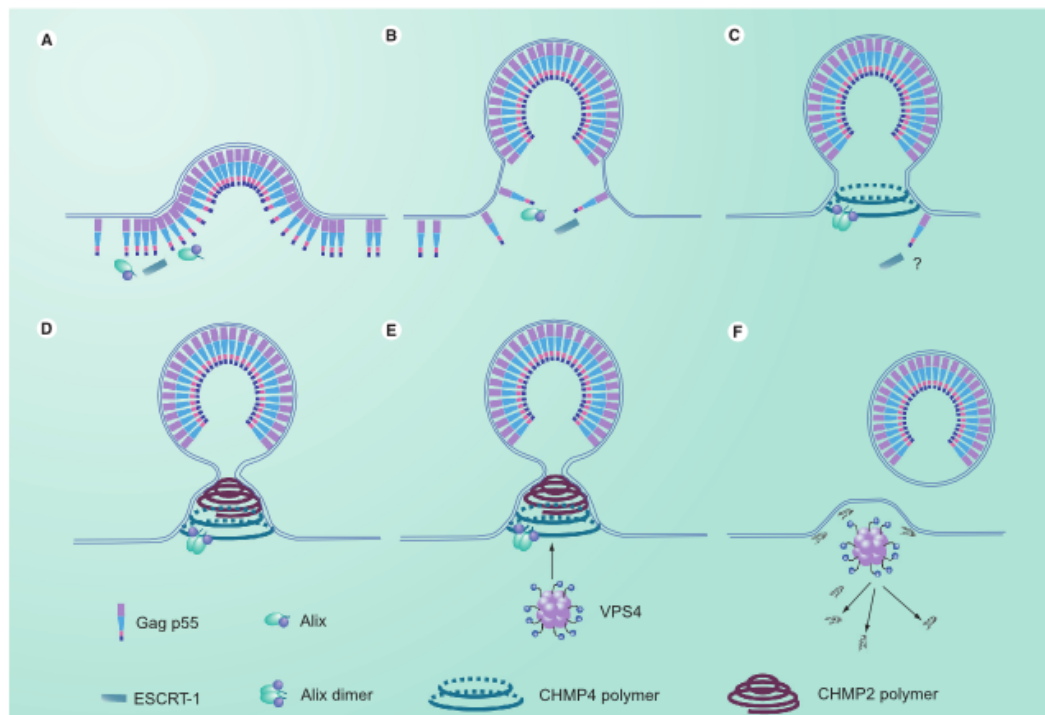


Figure 2. Model for ESCRT-driven HIV-1 release. (A) ESCRT-I and Alix accumulate at the plasma membrane concomitantly with Gag. (B) Alix and probably ESCRT-I stay until Gag recruitment and virus-like particle assembly are completed. (C) CHMP4 is recruited to form a polymer within the neck of the budding virus, which might induce constriction of the neck. CHMP4 recruitment might be mediated by Alix and Alix might be activated to dimerize and coordinate two CHMP4 filaments. (D) Once CHMP4 assembly is completed, it serves as a platform to assemble CHMP2 or CHMP2A-3 tubular structures that close at one end to form dome-like structures and induce further constriction leading to membrane neck thinning. However, the elastic stress imposed on the membrane might not yet be sufficient to induce fission. (E) Subsequent recruitment of VPS4 that forms dodecamers with the capacity to bind 12 CHMPs utilizes ATP hydrolysis to make the final cut by relieving the elastic membrane stress that leads to spontaneous fission (F) and concomitant release of CHMP monomers from the budding site.

ESCRT: Endosomal sorting complexes required for transport.

Future perspective & model for ESCRT-catalyzed membrane fission

The current data demonstrate that Gag assembly at the plasma membrane coincides with the appearance of Alix at the budding site [142]. ESCRT-I (Tsg101) might be recruited at the same time. Depending on the cell type and expression levels of Tsg101, multiple modes of entering the ESCRT machinery might be required to increase budding efficiency. We don't know whether ESCRT-I or Alix serve solely as platforms for protein-protein interactions or whether they play an active role at early stages of budding [145].

Once Gag assembly is completed, ESCRT-III is recruited [142]. Although Alix could bridge ESCRT-I and -III function, the question remains why Alix is present early in assembly and recruits ESCRT-III CHMP4 only after Gag assembly is completed. In addition, Alix is not absolutely required for HIV-1 budding; thus either ESCRT-I VPS28 interacting with CHMP6 could provide this link [119] or a yet unknown factor is needed to link ESCRT-I with ESCRT-III.

Based on the current data we suggest the following model for assembly and budding. Gag assembly at the plasma membrane coincides with ESCRT-I and Alix recruitment (Figure 2a & 2b). This somehow leads to ESCRT-III CHMP4 recruitment, which might require or lead to Alix dimerization as well as CHMP4 polymerization into filamentous structures that associate within the membrane neck of the budding virion (Figure 2c). Dimeric Alix might coordinate two turns of the helical CHMP4 polymer [93] and might thus substitute for ESCRT-II-mediated coordination of two Snf7/CHMP4 filaments [146]. Interestingly, CHMP4 filaments accumulate within the membrane neck in CHMP2-depleted cells [144]. This leads to nearly closed Gag lattices [144]; by contrast, Gag is arranged as a continuous but incomplete lattice in the released virion, indicating that proper assembly of ESCRT-III prevents Gag lattice closure [145]. What is the function of CHMP4 polymer assembly if it does not induce membrane fission [144]? One possibility is that it narrows the initially wide open neck connecting the plasma membrane and the virion membrane (Figure 2b & 2c). Subsequently, CHMP4 polymers serve as platform to recruit CHMP2 (Figure 2d) [144]. CHMP2A or B alone or CHMP2A together with CHMP3 might then assemble into dome-like structures that can bend the membrane sufficiently to induce

membrane neck thinning that is required for spontaneous fission (Figure 2d & 2e) [137]. One caveat is that such dome-like structures have only been observed for CHMP2A-3 polymers [129,136] and CHMP3 plays at most a minor role in release [144]. It thus remains to be determined whether CHMP2 isoforms can assemble into similar dome structures on their own. In favor of the dome model is the fact that CHMP2A can form ring-like structures, which have the smallest diameters (~12 nm) of any CHMP polymer analyzed so far *in vitro* [136]. Likewise *in vivo* imaging of CHMP2 polymers at the midbody revealed a CHMP2 polymer diameter of approximately 17 nm [73]; these data thus corroborate that CHMP2 has a key role in fission.

Finally, another open question is how the energy for fission is provided. Some of it might derive from ESCRT-III monomer to polymer transition on the membrane where the synergistic effect of polymer formation and membrane bending might come into play and keep the membrane in a stressed state. Although in theory accumulation of such elastic stress might suffice to induce fission, the execution of fission seems to require ATP hydrolysis by VPS4 [143]. The VPS4 dodecamer might be able to interact with 12 CHMP proteins simultaneously; its catalytic activity could thus exert mechanical force on the membrane-bound CHMP lattice in a synchronized fashion and induce abrupt relieve of the elastic stress, which could lead to spontaneous fission (Figure 2e). Concomitantly, this will lead to depolymerization of the CHMP lattice and recycling of ESCRT-III (Figure 2f).

Overall, the last decade brought about great progress in the understanding of HIV-1 budding and release. However, further work is required to decipher the exact role of many Gag interaction partners, to determine the function of early ESCRT budding factors, and to validate the fine mechanics of ESCRT-driven membrane fission.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

The role of structural proteins in HIV-1 assembly

- Budding is driven by the polyprotein Gag, which forms virus-like particles when expressed on its own.
- The production of infectious virions requires Env, genomic RNA and Gag–Pol, coding for the protease, the reverse transcriptase and the integrase.

Host cell factors involved in Gag trafficking

- Gag trafficking to the plasma membrane, the main site of virus assembly, is ensured by multiple cellular factors that regulate Gag mRNA transport and protein trafficking.

Factors supporting HIV-1 budding

- Gag recruits host cell factors that classify as not absolutely essential for HIV-1 budding such as Alix and ubiquitin.
- Engagement of these factors might play cell-type specific roles and provide additional support to enter the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) pathway; this might be especially important in cells expressing low levels of Tsg101 and help to divert more ESCRTs to the site of HIV-1 budding.

Central role of ESCRT-III in HIV-1 budding

- Access to ESCRT-III and the VPS4 machinery is essential for HIV-1 budding. Interference with ESCRT-III and VPS4 leads to fully assembled viral particles that fail to pinch off from the plasma membrane.
- ESCRT-III assembles into polymers that can deform membranes and is part of the minimal membrane fission machinery.

Dynamic assembly & minimal requirement of ESCRT-III and VPS4 at budding sites

- ESCRT-III and VPS4 appear only after Gag assembly is completed at the budding site.
- By contrast, Alix is present throughout the Gag assembly process.
- CHMP4 assembles first and provides a platform to recruit CHMP2 and VPS4.
- ESCRT-III CHMP4 and CHMP2 family members are required at the budding site to release virions.
- VPS4 plays an active role in the ESCRT-III-driven release process, potentially by providing energy for membrane fission.

Future perspective & model for ESCRT-catalyzed membrane fission

- What are the structural principles of ESCRT-III assemblies at the budding site?
- Data on ESCRT-III polymerization suggest a model, which entails initial membrane neck constriction by a polymer assembled by one of the three CHMP4 isoforms and subsequent recruitment of one CHMP2 family member, which catalyze membrane fission with the help of VPS4.
- Novel structural and functional approaches will be required to validate the model.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

- Jouvenet N, Neil SJ, Bess C et al. Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol.* 4(12), e435 (2006).
- Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(45), 19114–19119 (2009).
- Finzi A, Orthwein A, Merdier J et al. Productive human immunodeficiency virus type 1 assembly takes place at the plasma membrane. *J. Virol.* 81(14), 7476–7490 (2007).
- Ganser-Pomillos BK, Yeager M, Sundquist WL. The structural biology of HIV assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18(2), 203–217 (2008).
- Morita E, Sundquist WL. Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20(1), 395–425 (2004).
- Carlton JG, Martin-Serrano J. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316(5833), 1908–1912 (2007).
- Welsch S, Muller, B, Krausslich HG. More than one door – budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Lett.* 581(11), 2089–2097 (2007).
- Fujii K, Hurley JH, Freed EO. Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(12), 912–916 (2007).
- Bieniasz PD. The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe* 5(6), 550–558 (2009).
- Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F et al. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59(1), 103–112 (1989).
- Martin-Serrano J, Neil SJ. Host factors involved in retroviral budding and release. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(7), 519–531 (2011).
- Göttlinger H, Sodroski J, Haseltine W. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5781–5785 (1989).
- Zhou W, Parent L, Wills J et al. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* 68, 2556–2569 (1994).
- Hill CP, Worthylake D, Banerjee DP et al. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *PNAS* 93(7), 3099–3104 (1996).
- Ono A, Ablan SD, Lockett SJ et al. Phosphatidylinositol(4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(41), 14889–14894 (2004).
- Perez-Caballero D, Hatzioannou T, Martin-Serrano J et al. Human immunodeficiency virus type 1 matrix inhibits and confers cooperativity on gag precursor-membrane interactions. *J. Virol.* 78(17), 9560–9563 (2004).
- Li H, Dou J, Ding L et al. Myristoylation is required for human immunodeficiency virus type 1 Gag–Gag multimerization in mammalian cells. *J. Virol.* 81(23), 12899–12910 (2007).

18. Saad JS, Miller J, Tai J et al. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(30), 11364–11369 (2006).
19. Saad JS, Ablan SD, Ghanam RH et al. Structure of the myristylated human immunodeficiency virus type 2 matrix protein and the role of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate in membrane targeting. *J. Mol. Biol.* 382(2), 434–447 (2008).
20. Wilk T, Grossl, Gowen BE et al. Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 75(2), 759–771 (2001).
21. Briggs JA, Riches JD, Glass B et al. Structure and assembly of immature HIV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(27), 11090–11095 (2009).
22. Briggs JA, Krausslich HG. The molecular architecture of HIV. *J. Mol. Biol.* 410(4), 491–500 (2011).
23. Briggs JA, Simon MN, Grossl et al. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11(7), 672–675 (2004).
24. Wright ER, Schooler JB, Ding HJ et al. Electron cryotomography of immature HIV-1 virions reveals the structure of the CA and SP1 Gag shells. *EMBO J.* 26(8), 2218–2226 (2007).
25. Alfadhli A, Barklis RL, Barklis E. HIV-1 matrix organizes as a hexamer of trimers on membranes containing phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate. *Virology* 387(2), 466–472 (2009).
26. Lu K, Heng X, Summers MF. Structural determinants and mechanism of HIV-1 Genome Packaging. *J. Mol. Biol.* 410(4), 609–633 (2011).
27. Muriaux D, Darlix JL. Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. *RNA Biol.* 7(6), 744–753 (2010).
28. Kutluay SB, Bieniasz PD. Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS Pathog.* 6(11), e1001200 (2010).
29. Carlson LA, de Marco A, Oberwinkler H et al. Cryo electron tomography of native HIV-1 budding sites. *PLoS Pathog.* 6(11), e1001173 (2010).
30. Briggs JA, Wilk T, Welker R et al. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* 22(7), 1707–1715 (2003).
31. Ganser-Pornillos BK, Cheng A, Yeager M. Structure of full-length HIV-1 CA: a model for the mature capsid lattice. *Cell* 131(1), 70–79 (2007).
32. de Marco A, Muller B, Glass B et al. Structural analysis of HIV-1 maturation using cryo-electron tomography. *PLoS Pathog.* 6(11), e1001215 (2010).
33. Kohl NE, Emini EA, Schleif WA et al. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(13), 4686–4690 (1988).
34. Gottlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(15), 5781–5785 (1989).
35. Ono A. HIV-1 Assembly at the plasma membrane: Gag trafficking and localization. *Future Virol.* 4(3), 241–257 (2009).
36. Jin J, Sturgeon T, Chen C et al. Distinct intracellular trafficking of equine infectious anemia virus and human immunodeficiency virus type 1 Gag during viral assembly and budding revealed by bimolecular fluorescence complementation assays. *J. Virol.* 81(20), 11226–11235 (2007).
37. Jin J, Sturgeon T, Weisz OA et al. HIV-1 matrix dependent membrane targeting is regulated by Gag mRNA trafficking. *PLoS ONE* 4(8), e6551 (2009).
38. Ryo A, Tsurutani N, Ohba K et al. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(1), 294–299 (2008).
39. Joshi A, Garg H, Nagashima K et al. GGA and Arf proteins modulate retrovirus assembly and release. *Mol. Cell* 30(2), 227–238 (2008).
40. Joshi A, Nagashima K, Freed EO. Defects in cellular sorting and retroviral assembly induced by GGA overexpression. *BMC Cell Biol.* 10, 72 (2009).
41. Dong X, Li H, Derdowski A et al. AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell* 120(5), 663–674 (2005).
42. Batonić M, Favre M, Boge M et al. Interaction of HIV-1 Gag with the clathrin-associated adaptor AP-2. *Virology* 342(2), 190–200 (2005).
43. Camus G, Segura-Morales C, Molle D et al. The clathrin adaptor complex AP-1 binds HIV-1 and MLV Gag and facilitates their budding. *Mol. Biol. Cell* 18(8), 3193–3203 (2007).
44. Zhang F, Zang T, Wilson SJ et al. Clathrin facilitates the morphogenesis of retrovirus particles. *PLoS Pathog.* 7(6), e1002119 (2011).
45. Popov S, Strack B, Sanchez-Merino V et al. Human immunodeficiency virus type 1 and related primate lentiviruses engage clathrin through Gag-Pol or Gag. *J. Virol.* 85(8), 3792–3801 (2011).
46. Joshi A, Garg H, Ablan SD et al. Evidence of a role for soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) machinery in HIV-1 assembly and release. *J. Biol. Chem.* 286(34), 29861–29871 (2011).
47. Tomita Y, Noda T, Fujii K et al. The cellular factors Vps18 and Mon2 are required for efficient production of infectious HIV-1 particles. *J. Virol.* 85(11), 5618–5627 (2011).
48. Cooper J, Liu L, Woodruff EA et al. Filamin A interacts with human immunodeficiency virus type 1 Gag and contributes to productive particle assembly. *J. Biol. Chem.* 286(32), 28498–28510 (2011).
49. Gladnikoff M, Shimoni E, Gov NS et al. Retroviral assembly and budding occur through an actin-driven mechanism. *Biophys. J.* 97(9), 2419–2428 (2009).
50. Raposo GA, Moore M, Innes D et al. Human Macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* 3(10), 718–729 (2002).
51. Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J. Cell Biol.* 162(3), 443–455 (2003).
52. Jouve M, Sol-Foulon N, Watson S et al. HIV-1 buds and accumulates in "nonacidic" endosomes of macrophages. *Cell Host Microbe* 2(2), 85–95 (2007).
53. Benaroch P, Billard E, Gaudin R et al. HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology* 7, 29 (2010).
54. Ryzhova EV, Vos RM, Albright AV et al. Annexin 2: a novel human immunodeficiency virus type 1 Gag binding protein involved in replication in monocyte-derived macrophages. *J. Virol.* 80(6), 2694–2704 (2006).
55. Harriot AV, Ryzhova EV, Harvey T et al. Anx2 interacts with HIV-1 Gag at phosphatidylinositol(4,5) bisphosphate-containing lipid rafts and increases viral production in 293T cells. *PLoS ONE* 4(3), e5020 (2009).
56. Welsch S, Keppler OT, Habermann A et al. HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathog.* 3(3), e36 (2007).
57. Deneka M, Pelchen-Matthews A, Byland R et al. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J. Cell Biol.* 177(2), 329–341 (2007).
58. Bennett AE, Narayan K, Shi D et al. Ion-abeation scanning electron microscopy reveals surface-connected tubular conduits in HIV-infected macrophages. *PLoS Pathog.* 5(9), e1000591 (2009).

59. Welsch S, Groot F, Krauslich H-G et al. Architecture and regulation of the HIV-1 assembly and holding compartment in macrophages. *J. Virol.* 85(15), 7922–7927 (2011).
60. Göttlinger H, Dorfman T, Sodroski J et al. Effect of mutations affecting the p6 Gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3195–3199 (1991).
61. Huang M, Orenstein J, Martin M et al. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J. Virol.* 69, 6810–6818 (1995).
62. Parent L, Bennett R, Craven R et al. Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J. Virol.* 69, 5455–5460 (1995).
63. Strack B, Calistri A, Göttlinger HG. Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. *J. Virol.* 76(11), 5472–5479 (2002).
64. Martin-Serrano J, Perez-Caballero D, Bieniasz PD. Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *J. Virol.* 78(11), 5554–5563 (2004).
65. Demirov DG, Freed EO. Retrovirus budding. *Virus Res.* 106(2), 87–102 (2004).
66. Usami Y, Popov S, Popova E et al. The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochem. Soc. Trans.* 37(Pt 1), 181–184 (2009).
67. Bieniasz PD. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344(1), 55–63 (2006).
68. Hartlieb B, Weissenhorn W. Filovirus assembly and budding. *Virology* 344(1), 64–70 (2006).
69. Sakseena S, Sun J, Chu T et al. ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* 32(12), 561–573 (2007).
70. Hurley JH, Hanson PI. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11(8), 556–566 (2010).
71. Morita E, Sandrin V, Chung HY et al. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J.* 26(19), 4215–4227 (2007).
72. Morita E, Colf LA, Karren MA et al. Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 12889–12894 (2010).
73. Guizetti J, Schermelleh L, Mantler J et al. Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* 331(6024), 1616–1620 (2011).
74. Elia N, Sougrat R, Spurlin TA et al. Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(12), 4846–4851 (2011).
75. Garrus J, von Schwedler U, Pornillos O et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55–65 (2001).
76. Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz P. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.* 7, 1313–1319 (2001).
77. VerPlank L, Bouamr F, LaGrassa T et al. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7724–7729 (2001).
78. Strack B, Calistri A, Popova E et al. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114, 689–699 (2003).
79. von Schwedler UK, Stuchell M, Muller B et al. The protein network of HIV budding. *Cell* 114(6), 701–713 (2003).
80. Martin-Serrano J, Yarovsky A, Perez-Caballero D et al. Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(21), 12414–12419 (2003).
81. Vincent O, Rainbow L, Tilburn J et al. YPXLI is a protein interaction motif recognized by aspergillus PatA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol. Cell Biol.* 23(5), 1647–1655 (2003).
82. Strack B, Calistri A, Accola M et al. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13063–13068 (2000).
83. Yasuda J, Hunter E, Nakao M et al. Functional involvement of a novel Nedd4-like ubiquitin ligase on retrovirus budding. *EMBO Rep.* 3(7), 636–640 (2002).
84. Bouamr F, Melillo JA, Wang MQ et al. PPPYVVEPTAP motif is the late domain of human T-cell leukemia virus type 1 Gag and mediates its functional interaction with cellular proteins Nedd4 and Tsg101 [corrected]. *J. Virol.* 77(22), 11882–11895 (2003).
85. Fisher RD, Chung HY, Zhai Q et al. Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* 128(5), 841–852 (2007).
86. Fujii K, Munshi UM, Ablan SD et al. Functional role of Alix in HIV-1 replication. *Virology* 391(2), 284–292 (2009).
87. McCullough J, Fisher RD, Whitby FG et al. ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(22), 7687–7691 (2008).
88. Lee S, Joshi A, Nagashima K et al. Structural basis for viral late domain binding to Alix. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14(3), 194–199 (2007).
89. Zhai Q, Fisher RD, Chung HY et al. Structural and functional studies of ALIX interactions with YPX(n)L late domains of HIV-1 and EIAV. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15(1), 43–49 (2008).
90. Odorizzi G. The multiple personalities of Alix. *J. Cell Sci.* 119(15), 3025–3032 (2006).
91. Zhou X, Pan S, Sun L et al. The CHMP4b- and Src-docking sites in the Bro1 domain are autoinhibited in the native state of Alix. *Biochem. J.* 418(2), 277–284 (2009).
92. Zhai Q, Landesman MB, Chung HY et al. Activation of the retroviral budding factor ALIX. *J. Virol.* 85(17), 9222–9226 (2011).
93. Pires R, Hartlieb B, Signor L et al. A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure* 17(6), 843–856 (2009).
94. Munshi UM, Kim J, Nagashima K et al. An Alix fragment potentially inhibits HIV-1 budding: characterization of binding to retroviral YPX(L) late domains. *J. Biol. Chem.* 282(6), 3847–3855 (2007).
95. Usami Y, Popov S, Göttlinger HG. Potent rescue of human immunodeficiency virus type 1 late domain mutants by ALIX/AIP1 depends on its CHMP4 binding site. *J. Virol.* 81(12), 6614–6622 (2007).
96. Carlton JG, Agromayor M, Martin-Serrano J. Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(30), 10541–10546 (2008).
97. Popov S, Popova E, Inoue M et al. Human immunodeficiency virus type 1 Gag engages the Bro1 domain of ALIX/AIP1 through the nucleocapsid. *J. Virol.* 82(3), 1389–1398 (2008).
98. Dussupt V, Javid MP, Abou-Jaoude G et al. The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPXnL late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. *PLoS Pathog.* 5(3), e1000339 (2009).
99. Dussupt V, Sette P, Bello NF et al. Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are critical for late events of HIV-1 budding. *J. Virol.* 85(5), 2304–2315 (2011).
100. Popova E, Popov S, Göttlinger HG. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid p1 confers ESCRT pathway dependence. *J. Virol.* 84(13), 6590–6597 (2010).

101. Popov S, Popova E, Inoue M et al. Divergent Bro1 domains share the capacity to bind human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid and to enhance virus-like particle production. *J. Virol.* 83(14), 7185–7193 (2009).
102. Martin-Serrano J. The role of ubiquitin in retroviral egress. *Traff* 8(10), 1297–1303 (2007).
103. Jager S, Gottwein E, Krausslich HG. Ubiquitination of human immunodeficiency virus type 1 Gag is highly dependent on Gag membrane association. *J. Virol.* 81(17), 9193–9201 (2007).
104. Chung HY, Morita E, von Schwedler U et al. NEDD4L overexpression rescues the release and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 constructs lacking PTAP and YPX_L late domains. *J. Virol.* 82(10), 4884–4897 (2008).
105. Usami Y, Popov S, Popova E et al. Efficient and specific rescue of human immunodeficiency virus type 1 budding defects by a Nedd4-like ubiquitin ligase. *J. Virol.* 82, 4898–4907 (2008).
106. Zhadina M, Bieniasz PD. Functional interchangeability of late domains, late domain cofactors and ubiquitin in viral budding. *PLoS Pathog* 6(10), e1001153 (2010).
107. Weiss ER, Popova E, Yamanaka H et al. Rescue of HIV-1 release by targeting widely divergent NEDD4-type ubiquitin ligases and isolated catalytic HECT domains to Gag. *PLoS Pathog* 6(9), e1001107 (2010).
108. Martin-Serrano J, Eastman SW, Chung W et al. HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J. Cell Biol.* 168(1), 89–101 (2005).
109. Komander D, Clague MJ, Urbe S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10(8), 550–563 (2009).
110. Agromayor M, Martin-Serrano J. Interaction of AMSh with ESCRT-III and deubiquitination of endosomal cargo. *J. Biol. Chem.* 281(32), 23083–23091 (2006).
111. Zamborini A, Usami Y, Radoshitzky SR et al. Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(50), 19140–19145 (2006).
112. Solomons J, Sabin C, Poudevigne E et al. Structural basis for ESCRT-III CHMP3 recruitment of AMSh. *Structure* 19(18), 1149–1159 (2011).
113. Joshi A, Munshi U, Ablan SD et al. Functional replacement of a retroviral late domain by ubiquitin fusion. *Traff* 9(11), 1972–1983 (2008).
114. Gan X, Gould SJ. Identification of an inhibitory budding signal that blocks the release of HIV particles and exosome/microvesicle proteins. *Mol. Biol. Cell* 22(6), 817–830 (2011).
115. Da Q, Yang X, Xu Y et al. TANK-binding kinase 1 attenuates PTAP-dependent retroviral budding through targeting endosomal sorting complex required for transport-1. *J. Immunol.* 186(5), 3023–3030 (2011).
116. Langellier C, von Schwedler UK, Fisher RD et al. Human ESCRT-III complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *J. Virol.* 80(19), 9465–9480 (2006).
117. Im YJ, Wollert T, Boura E et al. Structure and function of the ESCRT-III-III interface in multivesicular body biogenesis. *Dev. Cell* 17(2), 234–243 (2009).
118. Kostelansky MS, Schluter C, Tam YY et al. Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell* 129(3), 485–498 (2007).
119. Pineda-Molina E, Belrhaili H, Pfeffer AJ et al. The crystal structure of the C-terminal domain of Vps28 reveals a conserved surface required for Vps20 recruitment. *Traff* 7(8), 1007–1016 (2006).
120. Medina GN, Ehrlich LS, Chen MH et al. Sprouty 2 binds ESCRT-I factor Eap20 and facilitates HIV-1 Gag release. *J. Virol.* 85(14), 7353–7362 (2011).
121. Davies BA, Babst M, Katzmann DJ. Regulation of Vps4 during MVB sorting and cytokinesis. *Traff* 12(10), 1298–1305 (2011).
122. Babst M, Wendland B, Estepa EJ et al. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* 17(11), 2982–2993 (1998).
123. Lin Y, Kimpler LA, Naismith TV et al. Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *J. Biol. Chem.* 280(13), 12799–12809 (2005).
124. Saksena S, Wahlman J, Teis D et al. Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* 136(1), 97–109 (2009).
125. Peol S, Machobane P, Martindale N et al. Divergent pathways lead to ESCRT-III catalyzed membrane fission. *Trends Biochem. Sci.* 36(4), 199–210 (2011).
126. Muziol T, Pineda-Molina E, Ravelli RB et al. Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev. Cell* 10(6), 821–830 (2006).
127. Shim S, Kimpler LA, Hanson PI. Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traff* 8(8), 1068–1079 (2007).
128. Lata S, Roessle M, Solomons J et al. Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *J. Mol. Biol.* 378(4), 818–827 (2008).
129. Bajorek M, Schubert HL, McCullough J et al. Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16(7), 754–762 (2009).
130. Rozycki B, Kim YC, Hummer G. SAXS ensemble refinement of ESCRT-III CHMP3 conformational transitions. *Structure* 19(1), 109–116 (2011).
131. Stuchell-Breton MD, Skalicky JJ, Kieffer C et al. ESCRT-III recognition by VPS4 ATPase. *Nature* 449(7163), 740–744 (2007).
132. Obita T, Saksena S, Ghazi-Tabatabai S et al. Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* 449(7163), 735–739 (2007).
133. Kieffer C, Skalicky JJ, Morita E et al. Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Dev. Cell* 15(1), 62–73 (2008).
134. Hanson PI, Roth R, Lin Y et al. Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* 180(2), 389–402 (2008).
135. This is the first report that shows CHMP4(Snf7) ESCRT-III polymerization deforms the plasma membrane into membrane tubes.
136. Ghazi-Tabatabai S, Saksena S, Short JM et al. Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Structure* 16(9), 1345–1356 (2008).
137. Lata S, Schoehn G, Jain A et al. Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science* 321(5894), 1354–1357 (2008).
138. Reports the in vitro reconstitution of a helical tubular ESCRT-III polymer composed of CHMP2A and CHMP3. The tube binds membranes on the outside and VPS4 on the inside suggesting that such structures assemble on the inside of a bud neck.
139. Fabrikant G, Lata S, Riches JD et al. Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput. Biol.* 5(11), e1000575 (2009).

- The computational model suggests that the membrane-binding affinity of ESCRT-III might be sufficient to provide the energy for fission.
138. Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD. The ESCRT Pathway. *Dev. Cell* 21(1), 77–91 (2011).
139. Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J et al. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458(7235), 172–177 (2009).
- Demonstrates for the first time that ESCRT-III is involved in membrane fission.
140. Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464(7290), 864–869 (2010).
- This report demonstrates that ESCRT-I and -II catalyze vesicle formation and ESCRT-III membrane fission.
141. Jouvenet N, Bieniasz PD, Simon SM. Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. *Nature* 454(7201), 236–240 (2008).
142. Jouvenet N, Zhadin M, Bieniasz PD et al. Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat. Cell Biol.* 13(4), 394–401 (2011).
- Reports that Gag and Alix progressively accumulate at viral assembly sites, while ESCRT-III and Vps4A were transiently recruited after completion of Gag assembly.
143. Baumgartel V, Ivanchenko S, Dupont A et al. Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component. *Nat. Cell Biol.* 13(4), 469–474 (2011).
- Utilized live-cell imaging to show that VPS4 is transiently recruited to HIV budding sites where it assembles into dodecamers, which reside at the site for ~35 s and disappear before particle release. First indication that VPS4 plays an active role in membrane fission.
144. Morita E, Sandrin V, McCullough J et al. ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe* 9(3), 235–242 (2011).
- Demonstrates that CHMP4 and CHMP2 ESCRT-III family members are the most important ESCRT-III proteins required for HIV release. CHMP4 interacts with CHMP2, and CHMP2 might make the final cut, supported by [73].
145. Carlson LA, Briggs JA, Glass B et al. Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis. *Cell Host Microbe* 4(6), 592–599 (2008).
146. Teis D, Saksena S, Judson BL et al. ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO J.* 29(5), 871–883 (2010).
147. Ghanam RH, Fernandez TF, Fledderman EL et al. Binding of calmodulin to the HIV-1 matrix protein triggers myristate exposure. *J. Biol. Chem.* 285(53), 41911–41920 (2011).
148. Thali M, Bukovsky A, Kondo E et al. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 372(6504), 363–365 (1994).
149. Lingappa JR, Docher JE, Newman MA et al. Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are required for interaction of HIV-1 gag with ABC1(HP68), a cellular protein important for HIV-1 capsid assembly. *J. Biol. Chem.* 281(7), 3773–3784 (2006).
150. Perugi F, Muriaux D, Ramirez BC et al. Human disc large is a new negative regulator of human immunodeficiency virus-1 infectivity. *Mol. Biol. Cell* 20(1), 498–508 (2009).

I.4.2 importance de l'ubiquitine dans ce mécanisme

La présence l'ubiquitine lors du processus de bourgeonnement viral est indéniable. En effet, il existe de nombreux liens entre l'ubiquitine, la polyprotéine gag et les protéines du système ESCRT : TSG101 et Alix. Tout d'abord la polyprotéine gag du HIV est ubiquitinée dans les régions NC et p6 (Ott et al., 1998) (Ott et al., 2000). De plus, TSG 101 et Alix sont aussi ubiquitinées et sont, en plus, capables de lier l'ubiquitine (Pornillos et al., 2002) (Pashkova et al., 2013) (Keren-Kaplan et al., 2013). Enfin, Alix peut recruter les ubiquitine-ligases de la famille de Nedd4 (Sette et al., 2010) et, en l'absence de domaines tardifs, la surexpression de Nedd4-2 permet de rétablir le bourgeonnement viral du VIH (Chung et al., 2008) (Usami et al., 2009) (Weiss et al., 2010). De nombreuses études ont soulevé l'importance de l'ubiquitine pour le bourgeonnement viral du VIH mais ce n'est que récemment que son rôle direct a été confirmé par l'étude de Sette et al. (Strack et al., 2000) (Patnaik et al., 2000) (Zhadina et al., 2007) (Sette et al., 2013).

II. Les protéines ESCRT

Comme nous avons pu le constater dans le chapitre précédent, les protéines du système ESCRT sont impliquées dans de nombreux processus biologiques. Chez l'homme, les complexes ESCRT ont initialement été découverts dans les années 2000 comme étant les acteurs du tri des récepteurs membranaires via la voie endo-lysosomale (Katzmann et al., 2001) (Babst et al., 2002a) (Babst et al., 2002b). Voici une vue d'ensemble de l'état actuel des connaissances de la machinerie ESCRT.

II.1 ESCRT-0

Le complexe ESCRT-0 est composé de deux sous-unités : HRS (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) et STAM (Signal Transducing Adaptor Molecule). Les premières études ont montré qu'en solution ces deux protéines s'assemblent pour former un hétérodimère allongé, d'environ 8 nm de long (Ren et al., 2009a). Par la suite, d'autres études ont déterminé que, en présence d'une membrane, HRS et STAM formeraient plutôt un hétérotrétramère (Mayers et al., 2011). La structure cristalline du cœur de l'hétérodimère chez la levure a été résolue en 2007 (Prag et al., 2007) et une modélisation du complexe entier a été réalisée deux années plus tard par recoupement des données obtenues par cristallographie aux rayons-X, par des mesures hydrodynamiques et par des simulations Monte Carlo (Ren et al., 2009a) (figure 6). La première sous-unité : STAM, contient trois domaines qui lient l'ubiquitine, ce sont les domaines VHS (VPS27, HRS et STAM), UIM (Ubiquitin Interacting Motif) et SH3 (Src homology 3) (Lange et al., 2012a) (Lange et al., 2011). De plus, cette sous-unité est aussi capable de lier l'ubiquitine-hydrolase AMSH (Associated Molecule of the

SH3 domain of STAM) et de l'activer notamment via son domaine SH3 (Tanaka et al., 1999) (Kim et al., 2006) (McCullough et al., 2006). Toutefois, à ce jour peu d'informations sont connues sur cette interaction et cette activation et nous reviendrons sur ces points dans un prochain paragraphe. La deuxième sous-unité : HRS, contient elle aussi les domaines VHS et DUIM (double-sided UIM) capables de lier l'ubiquitine, mais peut aussi interagir avec la clathrine, grâce à un domaine situé du côté C-terminal de la protéine, ainsi qu'avec les lipides PI(3)P (phosphatidylinositol 3-phosphate) grâce à son domaine FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, and EEA1) (Hofmann and Falquet, 2001) (Raiborg et al., 2001). Cette dernière interaction est à l'origine du recrutement du complexe ESCRT-0 à la membrane des endosomes (Stahelin et al., 2002) (Katzmann et al., 2003). A ce stade, le complexe ESCRT-0 reconnaît les chargements ubiquitinés et les rassemble en petits groupes. C'est la zone qui sera internalisée par la suite. Enfin, ESCRT-0 recrute ESCRT-I via l'interaction entre le motif PSAP, présent sur HRS, et le domaine UEV (Ubiquitin E2 variant) de la sous-unité TSG101 d'ESCRT-I (Pornillos et al., 2003). La façon dont le complexe ESCRT-0 est détaché de la membrane une fois sa mission accomplie n'a pas encore été élucidée. Il se pourrait qu'en se liant à ESCRT-I, la conformation de l'hétérodimère soit modifiée ce qui abolirait l'interaction membrane/ESCRT-0. Enfin, il est important de noter qu'ESCRT-0 intervient aussi dans le recyclage des récepteurs membranaires qui passent par la voie endosomale mais doivent retourner à la membrane. En effet, des études ont montré qu'ESCRT-0 dirige par exemple le récepteur β 2-adrenergic vers cette voie de recyclage (Hanyaloglu et al., 2005).

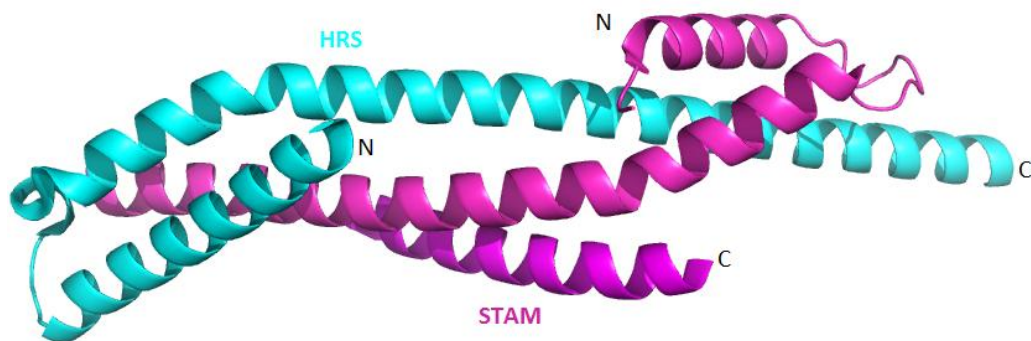


Figure 6 : Modélisation du complexe ESCRT-0. STAM est représentée en violet et HRS en bleu. N : extrémité N-terminale, C : extrémité C-terminale. (Code PDB : 3F1I, (Ren et al., 2009b))

II.2 ESCRT-I

ESCRT-I fut le premier complexe de la machinerie ESCRT caractérisé. Il agit de pair avec ESCRT-II et permet la formation d'une vésicule à l'intérieur des endosomes (Wollert and Hurley, 2010). Les quatre sous-unités qui appartiennent à ce complexe et forment un hétérotétramère sont TSG101, VPS37, VPS28 et MVB12 (Chu et al., 2006) (Curtiss et al., 2007) (Kostelansky et al., 2007) (Morita et al., 2007b) (Oestreich et al., 2007). La structure du cœur du complexe chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été déterminée par cristallographie aux rayons-X. Nous pouvons distinguer trois parties : la tête, la queue et entre

les deux, une longue tige rigide de 13 nm. La tête contient la partie C-terminale de VPS28 qui interagit avec le motif NZF de VPS36 d'ESCRT-II et permet son recrutement et la queue interagit avec ESCRT-0, l'ubiquitine et Alix, via le domaine UEV de TSG101 (Martin-Serrano et al., 2003) (Kostelansky et al., 2007) (Teo et al., 2004a). Cette structure est très allongée (18 à 25 nm) et très flexible en solution (Gill et al., 2007) (Boura et al., 2011)(Kostelansky et al., 2007) (figure 7). Chez les mammifères, il existe quatre gènes codant pour VPS37 (VSP37 A-D) et trois gènes codant pour MVB12 (MVB12A/B et UBAP1). Il y a ainsi 12 potentiels complexes ESCRT-I qui ont des localisations et des fonctions différentes. Par exemple le complexe contenant VPS37A, TSG101, VPS28 et UBAP1 intervient dans la voie endo-lysosomale mais n'est pas recruté pour le bourgeonnement viral (Stefani et al., 2011). Enfin, dans la cytokinèse, ESCRT-I est recruté via l'interaction entre TSG101 et la protéine impliqué dans la cytokinèse Cep55 et pourrait recruter à son tour ESCRT-III par l'intermédiaire d'Alix qui se lie à CHMP4 (Usami et al., 2007) (McCullough et al., 2008).

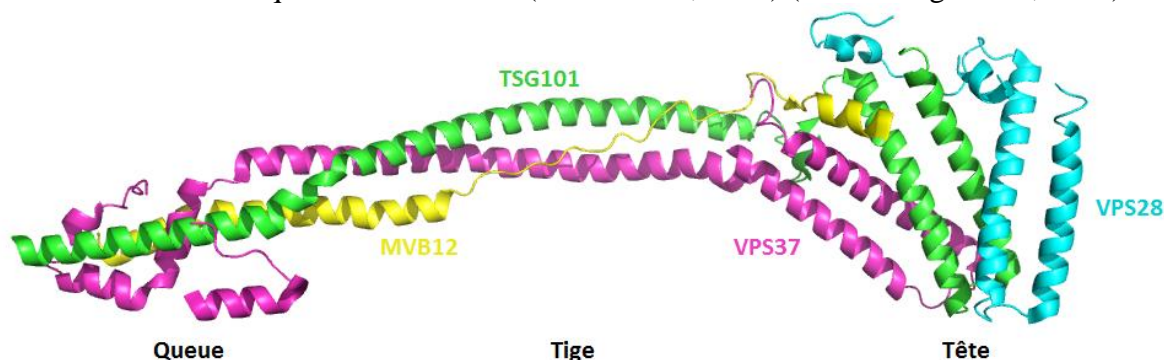


Figure 7 : Structure cristallographique des protéines au cœur du complexe ESCRT-I. TSG101 est représentée en vert, VPS37 en violet, VPS28 en bleu et MVB12 en jaune. (Code PDB : 2P22, (Kostelansky et al., 2007))

II.3 ESCRT-II

Comme mentionné précédemment, le complexe ESCRT-II fonctionne avec ESCRT-I afin de former une vésicule à l'intérieur des endosomes. Dans la voie endo-lysosomale, ce complexe permet aussi de connecter ESCRT-I et ESCRT-III grâce à son interaction avec VPS28 d'une part et VPS20 d'autre part (Gill et al., 2007) (Teis et al., 2010) (Teo et al., 2004b). Cependant, il n'est pas nécessaire dans d'autres mécanismes comme le bourgeonnement viral (Langelier et al., 2006) ou la cytokinèse (Carlton and Martin-Serrano, 2007). Chez la levure comme chez les mammifères, ce complexe est composé de quatre sous-unités : VPS22, VPS36 et deux exemplaires de VPS25. Les structures complète chez la levure et partielle chez l'homme ont été déterminées par cristallographie aux rayons-X et sont représentées dans la figure 8. Ce sont des structures compactes, en forme de Y et le cœur du complexe ESCRT-II chez la levure a un rayon hydrodynamique de 5 nm (Im and Hurley, 2008) (Hierro et al., 2004). La sous-unité VPS36 est responsable de l'interaction avec les lipides PI(3)P, l'ubiquitine et la partie C-terminale de la sous-unité VPS28 d'ESCRT-I, notamment grâce au domaine GLUE (GRAM-like ubiquitin-binding in Eap45) et à une hélice- α C-terminale (Alam et al., 2006)

(Hirano et al., 2006) (Teo et al., 2004a) (Slagsvold et al., 2005). VPS22, grâce à son hélice $\alpha 1$, est aussi capable d'interagir avec des lipides mais de façon moins spécifique.

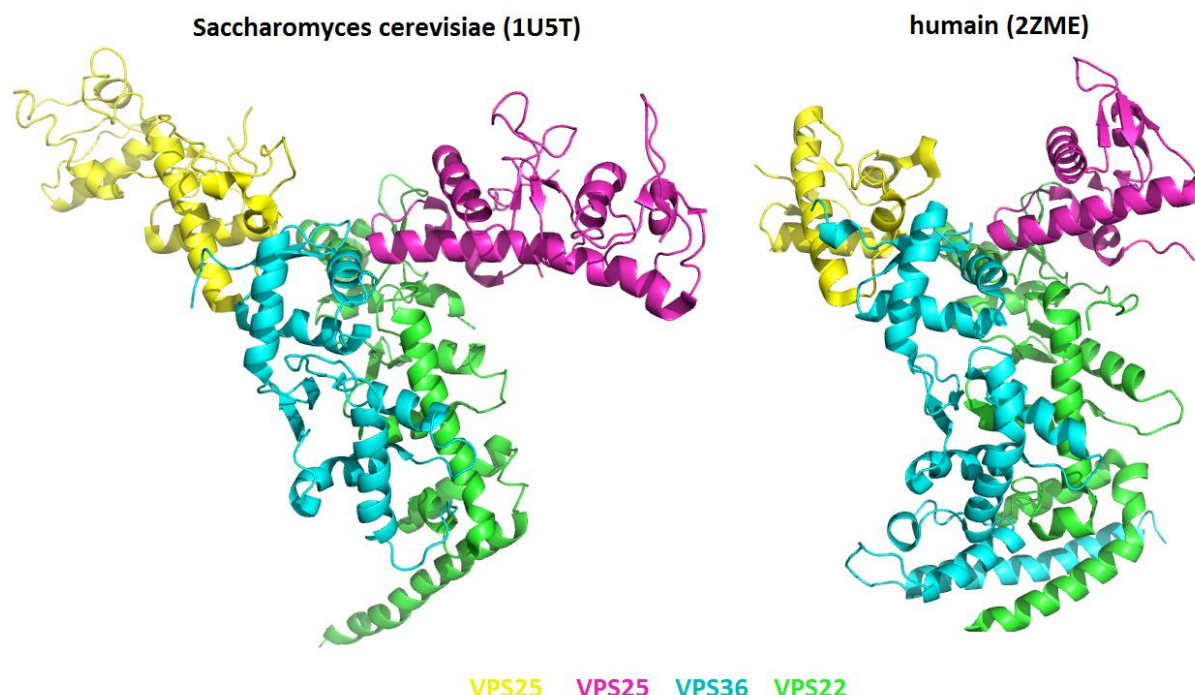


Figure 8 : Structure du complexe ESCRT-II chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et chez l'homme. Pour la forme humaine seul le cœur de la protéine a été cristallisé. (codes PDB : 1U5T et 2ZME, (Hierro et al., 2004) (Im et al., 2008))

II.4 ESCRT-III

Le complexe ESCRT-III est celui qui comporte le plus de sous-unités : 6 chez la levure et 12 chez l'homme. Elles sont appelées les protéines CHMP pour « Charged Multivesicular Body Protein » et sont numérotées de 1 à 7 mis à part une exception : IST1 (increased sodium tolerance-1). Certaines de ces sous-unités ont un rôle actif dans la scission membranaire (CHMP4, CHMP2, CHMP3, CHMP6) alors que d'autres sont des régulateurs des premières protéines ou de l'AAA ATPase VPS4 (CHMP1, CHMP5, CHMP7, IST1) (Teis et al., 2008) (Dimaano et al., 2008) (Nickerson et al., 2010). Ce sont toutes des molécules très chargées qui possèdent une partie N-terminale basique et une partie C-terminale acide (Muzioł et al., 2006). Lorsque la protéine est monomérique dans le cytosol, ceci permet une interaction entre ces deux domaines et entraîne une auto-inhibition (Lata et al., 2008a) (Bajorek et al., 2009b). Cette auto-inhibition, ou conformation fermée de la protéine, peut être levée grâce à l'interaction avec d'autre CHMP. Alors, certaines protéines comme CHMP4, CHMP2A/CHMP3 ou CHMP2B s'assemblent sous forme de polymères (Hanson et al., 2008) (Bodon et al., 2011) (Ghazi-Tabatabai et al., 2008) (Effantin et al., 2013b). Le modèle du mécanisme d'action des protéines d'ESCRT-III actuel est basé sur leur fonctionnement dans la voie endo-lysosomale. La machinerie de scission au cœur du complexe ESCRT-III est

recrutée séquentiellement à la membrane. D'abord CHMP6 est recrutée par le complexe ESCRT-II et se lie à la membrane afin d'encrer toute la machinerie et de créer une courbure (Fyfe et al., 2011). Puis elle interagit avec CHMP4 et active sa polymérisation. CHMP4 formerait alors des filaments et courberait la membrane plasmique (Hanson et al., 2008) (Pires et al., 2009). Le nombre de sous-unités impliquées dans chaque polymère est variable et ceci leur permet de s'adapter aux différentes tailles de vésicules. Par la suite, CHMP2A/3 ou CHMP2B sont recrutées et forment des tubes qui peuvent avoir une extrémité en forme de dôme (Effantin et al., 2013b). Ces polymères permettent de rétrécir le col de la vésicule et une scission spontanée pourra avoir lieu (Lata et al., 2008b) (Fabrikant et al., 2009) (Peel et al., 2011) (Guizetti and Gerlich, 2012). Enfin, l'AAA ATPase VPS4 (Vacuolar Protein Sorting) sera recrutée ce qui amorcera le désassemblage et le recyclage des sous-unités ESCRT-III (Wollert et al., 2009) (Saksena et al., 2009). Il est aussi possible que ce soit grâce à l'action de désassemblage des CHMP par VSP4 que l'énergie nécessaire à la fission membranaire soit apportée. Tout au long de ce processus, les protéines CHMP interagissent avec différents partenaires : soit entre elles grâce à leurs régions acides et basiques, soit avec des protéines associées au système ESCRT grâce à une interaction entre les domaines MIM (MIT interacting motif) des CHMP et MIT (microtubule interacting and transport) des partenaires. Nous reviendrons sur ces interactions dans le paragraphe 1-2-6.

II.5 VPS4

VPS4 (Vacuole sorting protein 4) est le dernier acteur de la machinerie ESCRT. Ce dodécamère, composé de deux anneaux hexamériques empilés de façon décalée, est présent en deux formes chez l'homme : VSP4A et VPS4B (figure 9). Cette enzyme est recrutée à la membrane grâce à l'interaction de son domaine MIT avec le domaine MIM des protéines CHMP et notamment CHMP2 (Kieffer et al., 2008) (Obita et al., 2007) (Stuchell-Brereton et al., 2007). Cette AAA ATPase désassemble les sous-unités du complexe ESCRT-III grâce à l'énergie apportée par l'hydrolyse de l'ATP en ADP. Les polymères de CHMP seraient ainsi insérés dans le pore central des deux anneaux et changeraient de conformation ce qui induirait leur dépolymérisation. De plus, la protéine LIP5 qui interagit avec VSP4, stabilise le dodécamère et stimule son activité (Azmi et al., 2006) (Shim et al., 2008).

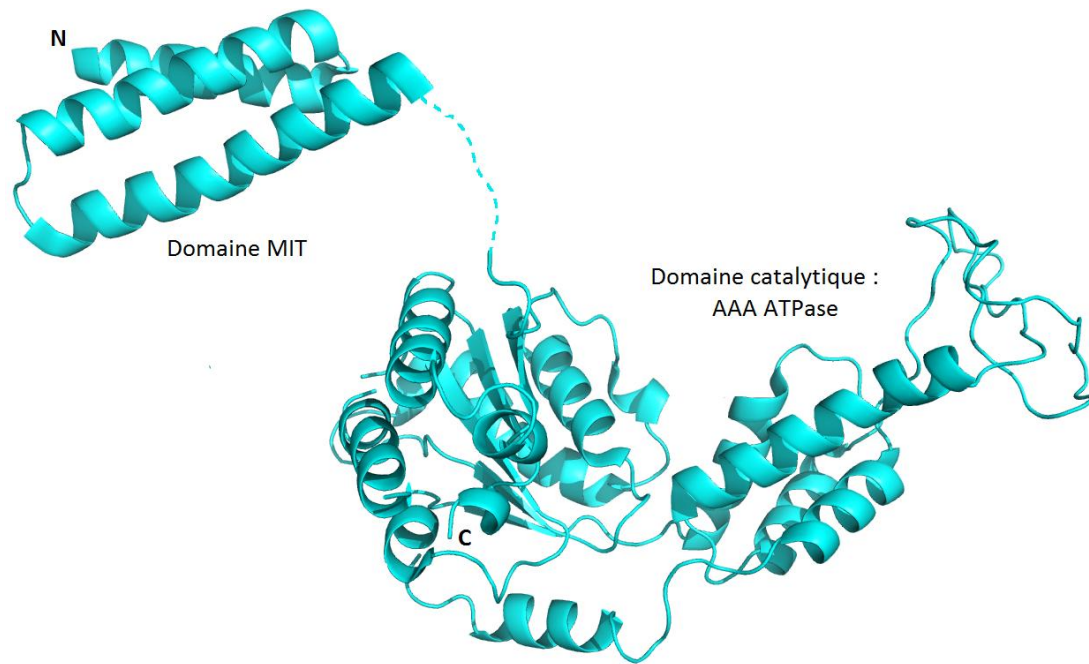


Figure 9 : Représentation en ruban de la structure des domaines MIT et AAA ATPase de VSP4. (Code PDB : Domaine MIT : 2JQK, Domaine AAA ATPase : 2QPA)

II.6 Les interactions des domaines MIT/MIM

Beaucoup des interactions entre les protéines CHMP et leur partenaires sont réalisées grâce à leurs domaines MIT/MIM. Certaines ont été étudiées en détail et le tableau 1 reprend toutes les interactions MIT/MIM connues pour les protéines du complexe ESCRT-III et indique leurs références. Cependant, malgré l'implication de domaines similaires, ces interactions ne sont pas toutes identiques. En effet, les résidus mis en jeu ainsi que la force de l'interaction varient d'un complexe à l'autre. Ceci est dû au fait qu'un domaine MIT contient trois hélices- α rassemblées en faisceau avec lequel les domaines MIM interagissent. Ces derniers peuvent alors contacter n'importe quel résidu d'une des hélices- α et former différentes surfaces d'interaction. Ainsi, le complexe AMSH/CHMP3 interagit de façon très forte et a une constante d'affinité de 63 nM (Solomons et al., 2011) alors que le complexe VPS4/CHMP1B est beaucoup plus faible avec une constante d'affinité de 29 μ M (Stuchell- Brereton et al., 2007).

Protéines avec domaine MIT	Interactions connues	Références
LIP5	CHMP5, 1B, 2A,3 IST1	Yang et al , 2012 Skalicky et al, 2012
VPS4	CHMP1A-B/2A-C/3/4A-C/6, IST1	Stuchell-Brereton et al., 2007 Bajorek et al, 2009
AMSH	CHMP1A-B,2A,3	Monica Agromayor and Juan Martin-Serrano, 2006
UBPY	CHMP1A-B/7	Row et al, 2007
Spastin	CHMP1B	Reid et al, 2004 Yang et al, 2008
Calpain7	CHMP1A-B/4B, IST1	Yorikawa, 2007 Osako, 2010

Tableau 1 : Récapitulatif des protéines impliquées dans le système ESCRT contenant un domaine MIT et leur partenaire au sein du complexe ESCRT-III.

II.7 Alix

Alix (ALG-2 interacting protein) fut tout d'abord découverte en 1999 comme une nouvelle protéine interagissant avec ALG-2 (Apoptosis-linked gene 2 protein) et ce n'est qu'à partir de 2003 que le lien entre cette protéine et le bourgeonnement viral, puis le système ESCRT, a été élucidé (Missotten et al., 1999) (Strack et al., 2003). Cette protéine est composée de trois domaines : le domaine Bro1, situé à l'extrémité N-terminale, interagit avec CHMP4 et la nucléoprotéine du VIH-1 (figure 10) (Katoh et al., 2003) (McCullough et al., 2008) (Popov et al., 2008), le domaine V, au centre, permet la dimérisation ainsi que l'interaction avec le domaine tardif YP(Xn)L du VIH-1 (Pires et al., 2009) (Martin-Serrano et al., 2003) (Strack et al., 2003) et enfin, la partie C-terminale, qui comporte une région riche en proline et qui est à l'origine de l'interaction avec TSG101 et Cep55 (Morita et al., 2007a).

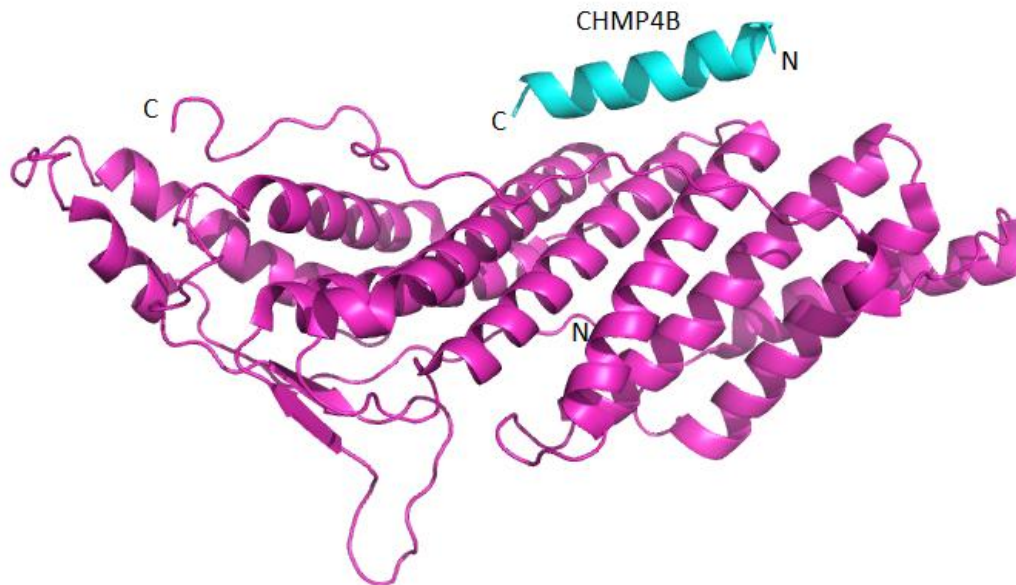


Figure 10 : Structure du domaine Bro1 d'Alix en complexe avec CHMP4B. Violet : Alix, bleu : peptide CHMP4B, N : extrémité N-terminale, C : extrémité C-terminale. (Code PDB : 3C3Q, (McCullough et al., 2008))

II.8 Implication dans les mécanismes cellulaires

Les mécanismes que nous avons abordés dans la première partie de cette introduction ne nécessitent pas tous l'implication des mêmes protéines ESCRT. En effet, il semblerait que la voie endo-lysosomale implique tous les membres de chaque complexe alors que le bourgeonnement viral par exemple, n'utilise pas le complexe ESCRT-II. La figure 11 récapitule les mécanismes dans lesquels les complexes ESCRT interviennent (Henne et al., 2011) (Morita et al., 2010) (Morita et al., 2011).

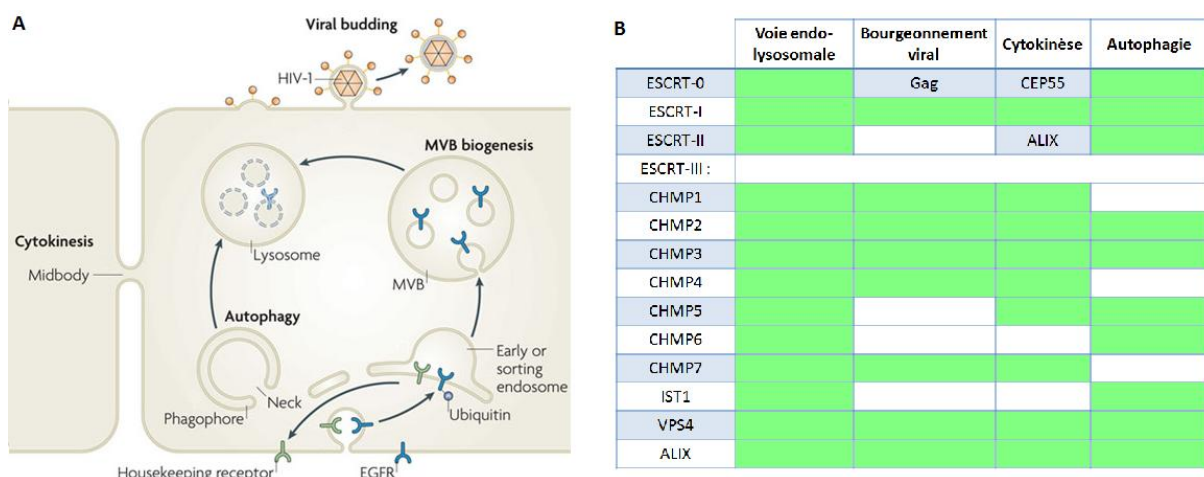


Figure 11 : (Légende page suivante)

Implication des protéines ESCRT dans les différents mécanismes cellulaires. A) Représentation schématique de la voie endo-lysosomale, l'autophagie, le bourgeonnement viral et la cytokinèse (Hurley and Hanson, 2010). B) Tableau récapitulatif de la présence ou non des protéines ESCRT. Vert : impliqué dans ce mécanisme, Bleu : substitué par un autre élément, Blanc : non impliqué et pas de substitution connue

III. L'ubiquitine et ses enzymes associées

III.1 L'ubiquitine

L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés impliquée dans de multiples voies cellulaires. En effet, cette protéine peut être attachée le plus souvent de façon covalente sur les lysines d'un substrat et ainsi le diriger vers les différentes voies de dégradation cellulaires mais elle est aussi engagée dans les mécanismes de réparation de l'ADN, de trafic cellulaire, de réponse immunitaire innée, de remodelage de la chromatine...(Chen and Qiu, 2013) (Pinder et al., 2013) (Wickliffe et al., 2009) (Urbé et al., 2006). La liaison entre l'ubiquitine et le substrat est une liaison isopeptidique formée par l'action de trois enzymes : une enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1), une enzyme conjugante (E2) et une ubiquitine-ligase (E3) (Pickart and Eddins, 2004). Tout d'abord, l'enzyme E1 active l'ubiquitine de façon dépendante de l'ATP en formant une liaison thiol-ester entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine et le groupement thiol d'une cystéine de l'E1. Ensuite, cette ubiquitine activée est transférée sur l'enzyme E2 formant un complexe E2-ubiquitine thiol-ester puis, l'enzyme E3 (cas de la famille HECT) transférera à son tour l'ubiquitine de l'enzyme E2 vers le substrat en formant une liaison isopeptidique entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine et le groupement amine de la chaîne latérale d'une lysine du substrat. Dans la majorité des cas (enzymes E3 à domaine RING), l'enzyme E2 transfère l'ubiquitine au substrat, l'E3 ne servant qu'à la reconnaissance du substrat. Cette liaison peut être rompue par l'action d'une ubiquitine-hydrolase ou dé-ubiquitinase (DUB) (figure 12).

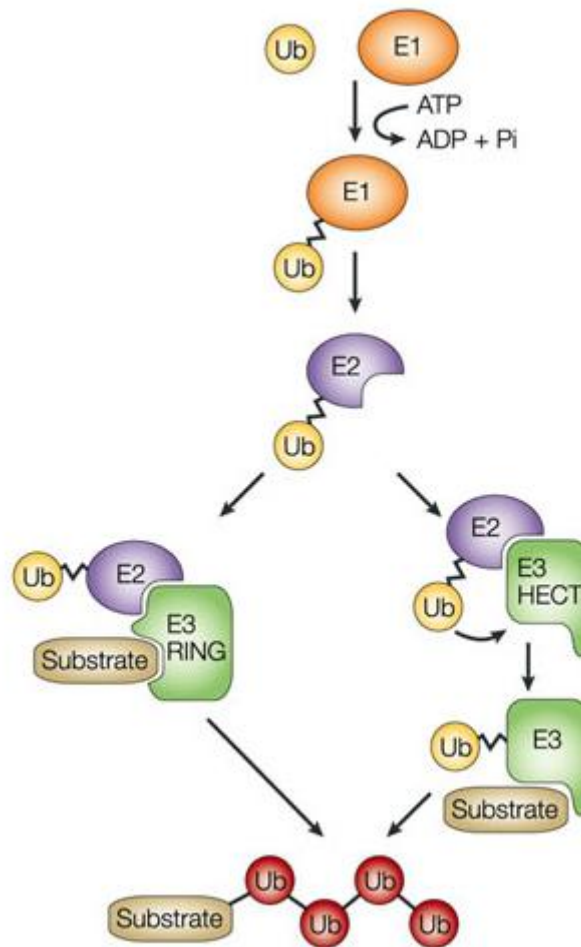


Figure 12 : Fonctionnement des enzymes E1, E2, E3. Ub : Ubiquitine, E1 : enzyme activatrice, E2 : Enzyme conjugante, E3 : ubiquitine-ligase. (Di Fiore et al., 2003)

En ce qui concerne sa structure, l'ubiquitine est une protéine compacte qui comporte un feuillet β à 5 brins antiparallèles qui surplombe une hélice- α (figure 13). Sa surface est globalement polaire sauf à l'extrémité C-terminale du feuillet β où nous retrouvons une région hydrophobe formée par les acides aminés Leucine 8, Isoleucine 44 et Valine 70 (Vijay-Kumar et al., 1987).

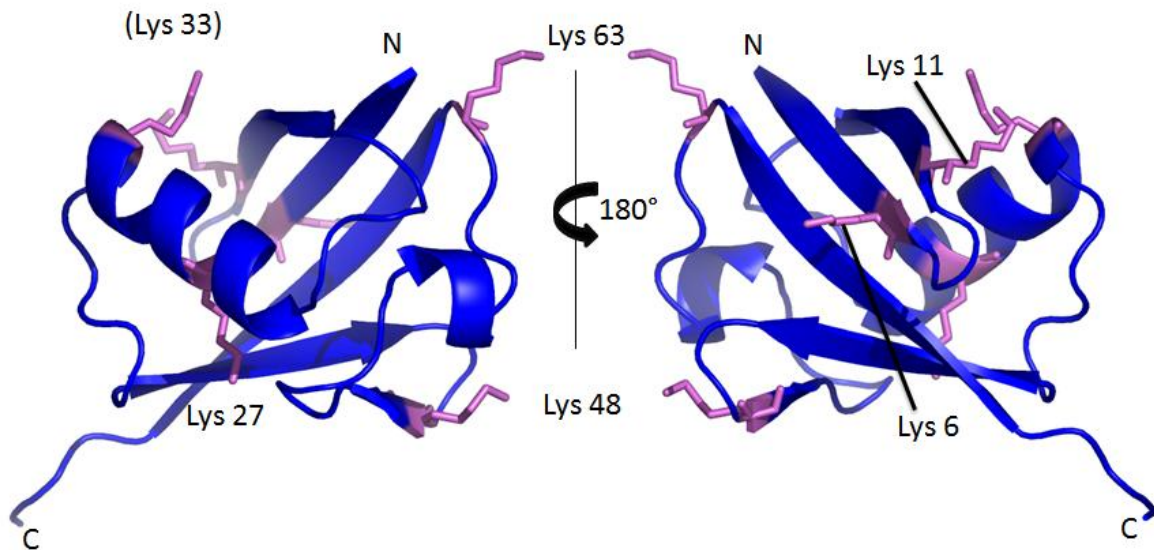


Figure 13 : Monomère d'ubiquitine. N : extrémité N-terminale, C : extrémité C-terminale. Les lysines sont colorées en violet clair. (Code PDB : 1UBQ, (Vijay-Kumar et al., 1987))

Ce monomère, dont le stock cellulaire est maintenu grâce à l'action de dé-ubiquitinasés qui clivent des protéines précurseurs, est en fait la première brique nécessaire à la formation des chaînes polyubiquitine qui apporteront une plus grande spécificité et seront impliquées dans des phénomènes distincts.

III.2 Les chaînes de polyubiquitine

Les sept lysines présentes dans le monomère d'ubiquitine peuvent servir de base à l'attachement d'une autre molécule d'ubiquitine ce qui formera des chaînes polyubiquitine. Les différentes chaînes sont dénommées selon la lysine qui lie les monomères. Il est donc possible de former des chaînes polyubiquitine K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 ou linéaires, lorsque les monomères sont reliés par leurs extrémités N-terminale et C-terminale. Chacun de ces polymères existe chez les eucaryotes (Xu et al., 2009) (Ye and Rape, 2009) et a un rôle dans un ou plusieurs processus cellulaires (figure 14) (Husnjak and Dikic, 2012).

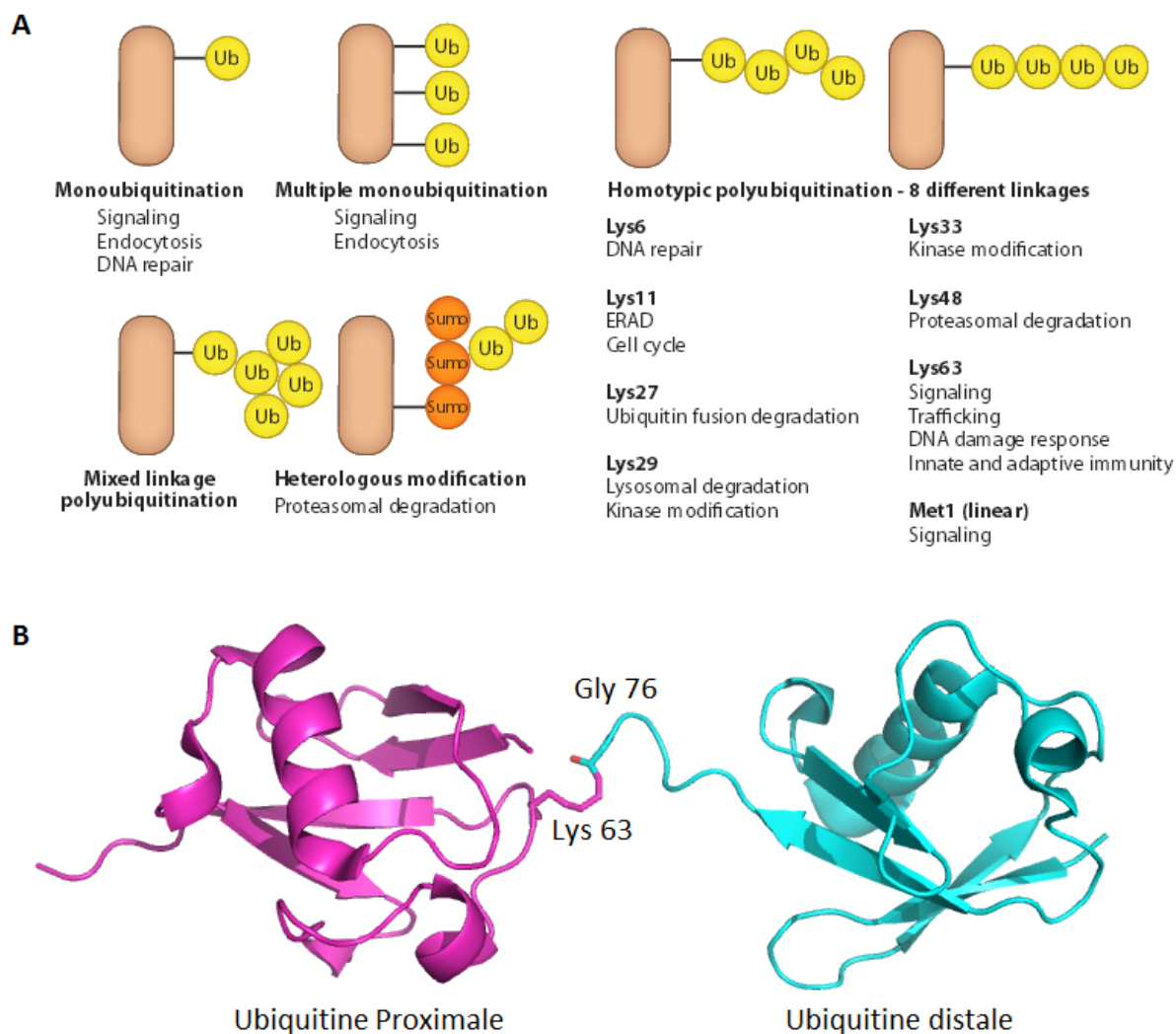


Figure 14 : Formation des chaînes de polyubiquitine. A) Différents types d'ubiquitination et de chaînes de polyubiquitine et leur implication dans les mécanismes cellulaires (Husnjak and Dikic, 2012). B) Di-ubiquitine liée K63. Ub : Ubiquitine, ERAD : dégradation associée au réticulum endoplasmique. (Code PDB : 3H7P)

Certaines protéines de membrane plasmique, dégradées via la voie endo-lysosomale sont modifiées par les chaînes K63. Ce signal joue un rôle dans l'internalisation de certaines protéines et est important pour le ciblage des récepteurs, canaux ou transporteurs vers les zones invaginées des corps multivésiculaires. Il entraîne le recrutement du premier complexe de la machinerie ESCRT : ESCRT-0. Ce dernier, ainsi qu'ESCRT-I et ESCRT-II contiennent de nombreux domaines de liaison à l'ubiquitine appelés UBD (Ubiquitin Binding Domain) ce qui leur permet de prendre en charge les chargements à dégrader (tableau 2) (Husnjak and Dikic, 2012). Ceci est particulièrement vrai pour l'hétérotétramère HRS/STAM qui est capable de lier plusieurs ubiquitines en même temps (Mayers et al., 2011) (Lange et al., 2012a).

Complexe	Sous-unité	Domaine
ESCRT-0	HRS	VHS, DUIM, GAT
	STAM	VHS, UIM, SH3, GAT
ESCRT-I	VPS23	UEV
ESCRT-II	VPS36	GLUE, NZF1, NZF2

Tableau 2 : Domaines interagissant avec l'ubiquitine au sein du système ESCRT. VHS : Vps27, HRS and STAM, (D)UIM : (double-sided) ubiquitin-interacting motif, GAT : GGA and TOM, SH3 : SRC homology 3, UEV : ubiquitine E2 variant, GLUE : GRAM-like ubiquitine-binding in EAP45, NZF : Npl4-type zinc finger.

III.3 Les ubiquitine-ligases

Il existe deux grandes familles d'ubiquitine-ligases E3 : les E3 à domaine HECT et les E3 à domaine RING. Chez les mammifères, on dénombre dans le génome plus de 600 potentielles E3 dont seulement 30 appartiendraient à la famille des E3 à domaine HECT. La spécificité pour un substrat est due à sa reconnaissance par la combinaison E2/E3 ou uniquement par une E3. En ce qui concerne les protéines membranaires transitant via la voie endo-lysosomale, il semblerait que deux ubiquitine-ligases agissent plus particulièrement : Nedd4 et Cbl (Metzger et al., 2012) (Hurley and Stenmark, 2011).

Nedd4-2, qui appartient à la famille des E3 à domaine HECT, est notamment impliquée dans l'attachement d'une molécule d'ubiquitine sur le canal sodium épithélial (ENaC) (Debonneville and Staub, 2004). Dans ce cas, le domaine catalytique HECT de Nedd4-2 interagit avec l'E2 grâce à sa partie N-terminale, aussi appelée lobe N-terminal, et l'ubiquitine est transférée de l'E2 vers l'E3 en formant un intermédiaire thiol-ester grâce à la cystéine du site actif présent à l'extrémité C-terminale de l'E3 (Lobe C-ter) (figure 15) (Kamadurai et al., 2009). L'ubiquitine-ligase transfère ensuite l'ubiquitine sur l'ENaC, l'interaction mettant en jeu les domaines WW de Nedd4 et des motifs PPxY sur les sous-unités de ENaC. Ce signal sera reconnu par ESCRT-0 et le canal ionique sera dégradé via la voie endo-lysosomale. Les autres domaines de Nedd4-2 consistent en un domaine C2 en N-ter, qui lie le calcium et interagit avec la membrane, et quatre domaines WW qui interagissent avec les motifs PPXY ou PPPNYDSL d'ENaC (Fotia et al., 2003) (Lott et al., 2002) (Snyder et al., 2001).

c-Cbl est une autre ubiquitine-ligase marquant les récepteurs membranaires pour les diriger vers la voie endo-lysosomale et plus particulièrement le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) (Levkowitz et al., 1998). En partant de l'extrémité N-ter vers l'extrémité C-ter cette E3 possède : un domaine de liaison à la tyrosine kinase (domaine TKB), un

domaine RING, qui est le domaine ubiquitine-ligase, un domaine riche en proline, une région non structurée et riche en serines et thréonines et un domaine UBA (ubiquitin associated domain). Cette ubiquitine-ligase ne forme pas de liaison covalente avec l'ubiquitine et est juste un adaptateur entre l'E2 et l'ubiquitine pour que l'enzyme conjugante puisse attacher la molécule au substrat. Le domaine RING est formé par des résidus cystéines et histidines qui sont placés à intervalle régulier et coordonnés par deux ions de zinc, ce qui forme une structure en croisillon et facilite le transfert de l'ubiquitine (figure 15) (Lorick et al., 1999) (Zheng et al., 2000).

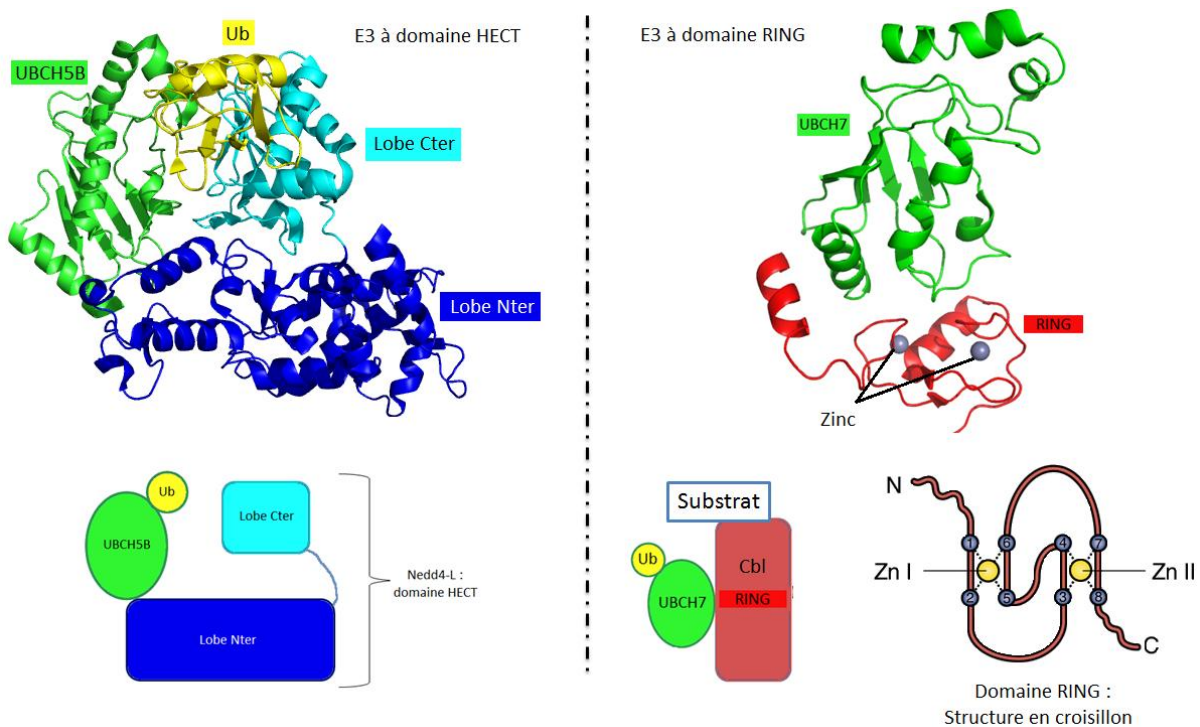


Figure 15 : Exemples d'ubiquitine-liages E3 à domaine HECT et à domaine RING. Panneau de gauche : Structure et représentation schématique du domaine HECT Nedd4-L en complexe avec l'E2 UBCH5B et l'ubiquitine. Panneau de droite : Structure et représentation schématique du domaine RING de Cbl en complexe avec l'E2 UBCH7. Figure adaptée de J.Cell Sci. (2012) 125, 529-535

L'action de ces ubiquitine-ligases est opposée à celle des ubiquitines-hydrolases qui ont elles aussi un rôle primordial au sein des processus cellulaires et que nous aborderons plus en détail dans le chapitre suivant.

III.4 Les ubiquitine-hydrolases

III.4.1 Informations générales

D'après l'étude de Nijman et al. en 2005, il existerait environ 100 ubiquitine-hydrolases, aussi appelées DUB (dé-ubiquitinases), codées au sein du génome humain (Nijman et al., 2005).

Une grande partie de ces DUB sont actives et hydrolysent la liaison isopeptidique qui relie l'ubiquitine à un substrat et les DUB appartenant à l'autre partie, inactives, auraient un rôle d'armature. Ces ubiquitine-hydrolases sont organisées en 5 familles : les USP (ubiquitin-specific proteases), les UCH (ubiquitin C-terminal hydrolases), les OTU (ovarian tumour proteases), les Josephins et les métalloprotéases dépendantes du zinc à domaine JAMM (Komander et al., 2009). Les 4 premières familles sont des protéases à cystéine et ont un mécanisme commun, alors que la dernière famille a son propre fonctionnement.

Les protéases à cystéine ont un site actif composé d'une diade ou triade de résidus (histidine, cystéine et éventuellement asparagine ou acide aspartique) qui réalisent l'hydrolyse de liaison isopeptidique : la chaîne latérale de l'histidine diminue le pKa de la cystéine catalytique ce qui permet une attaque nucléophile de la liaison. Le troisième acide aminé permet d'aligner et de polariser l'histidine mais n'est pas présent dans toutes les protéases à cystéine. L'organisation de ce site actif et son accessibilité sont différentes selon les DUB (Komander et al., 2009).

Le domaine USP des membres de la famille éponyme contient trois sous-domaines appelés « paume, pouce et doigts » en référence à sa structure en forme de main. Le site catalytique est à l'interface entre la paume et le pouce et les doigts permettent d'entrer en contact avec l'ubiquitine distale (figure 16). Pour certaines USP, il existe une forme active et une forme inactive de l'enzyme et des changements conformationnels permettent l'activation lors de la liaison à l'ubiquitine (Hu et al., 2002).

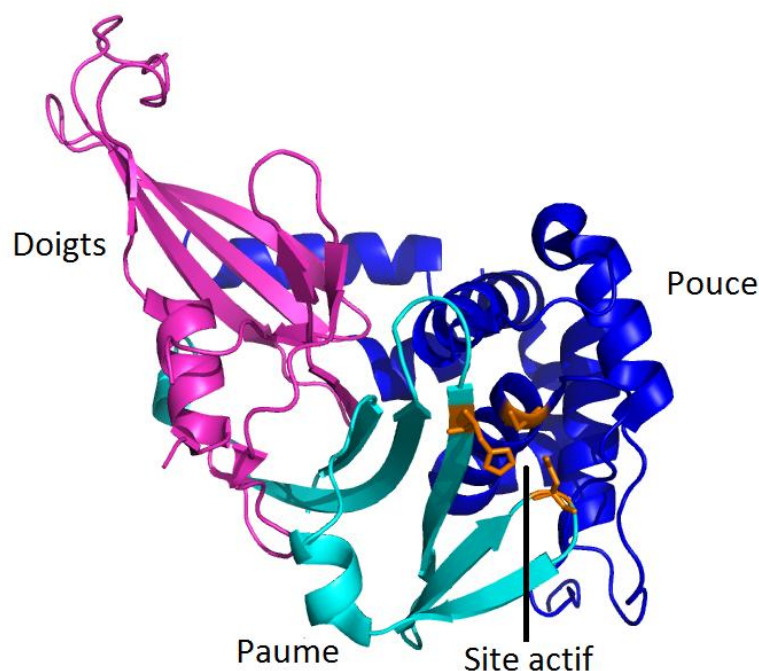


Figure 16 : Structure du domaine USP de l'enzyme USP21. (Code PDB : 2Y5B) En violet : le sous-domaine des doigts. Bleu cyan : sous-domaine de la paume. Bleu foncé : sous-domaine du pouce. Orange : Histidine, Cystéine et Asparagine catalytiques.

Le domaine OTU peut lui aussi adopter une conformation active ou inactive lorsque la cystéine et l'histidine catalytiques ne sont pas alignées. Il existe trois sous-catégories de

domaines OTU qui ont divergé au cours de l'évolution : les Otubains, les A-20 like OTU et les OTU. Les Otubains et les A-20 like OTU comportent des insertions supplémentaires par rapport au domaine OTU (figure 17). Leur mécanisme d'hydrolyse reste similaire mais leurs liaisons à l'ubiquitine diffèrent (Komander and Barford, 2008) (Nanao et al., 2004) (Messick et al., 2008).

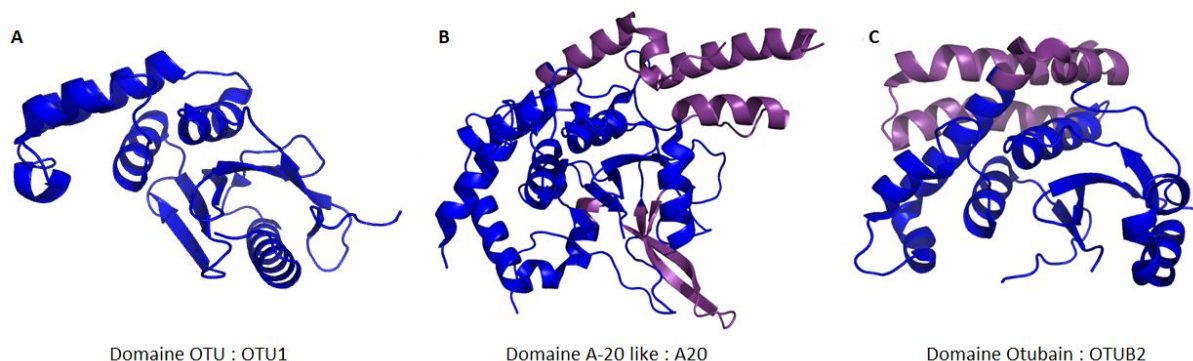


Figure 17 : Structures des différents domaines OTU. A) Famille des OTU : Domaine OTU d'OTU1 (Code PDB : 3BY4). B) Famille des A-20 like OTU : Domaine OTU d'A20 (Code PDB : 2VFJ). C) Famille des Otubains : Domaine OTU d'OTUB2 (Code PDB : 1TFF). Bleu : cœur du domaine OTU. Violet : Insertions par rapport à la famille OTU.

Enfin, en ce qui concerne les deux dernières familles, les domaines UCH se différencient par leur boucle flexible qui cache le site actif et permet la sélection des substrats de petite taille et les domaines Josephins contiennent eux aussi une hélice- α qui régule l'accès au site actif ainsi qu'une région polyglutamine qui, lorsqu'elle est étirée, est la cause de la maladie neurodégénérative de Machado-Joseph (Johnston et al., 1997) (Costa and Paulson, 2012).

Le mécanisme d'action des ubiquitines hydrolases à domaine JAMM a été étudié plus particulièrement pour les ubiquitine-hydrolases AMSH-LP et AMSH et sera donc expliqué dans le paragraphe les concernant.

Plusieurs travaux ont montré que les DUB ont de nombreuses fonctions et sont impliquées dans des voies cellulaires très variées. Parmi celles-ci nous retrouvons : la signalisation cellulaire, avec notamment un rôle dans la voie NF- κ B, la régulation de la transcription, la modification des histones, la réparation de l'ADN, la formation de la réserve d'ubiquitine libre mais aussi le contrôle qualité des protéines ainsi que leur dégradation via la voie endo-lysosomale (Reyes-Turcu et al., 2009) (Clague et al., 2012). L'omniprésence de ces enzymes au sein de la cellule implique la nécessité d'une forte régulation. Celle-ci peut être effectuée par trois moyens :

- Des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, l'ubiquitination ou la sumoylation qui active ou inactive l'enzyme (Hunter, 2007) (Meulmeester et al., 2008)
- Des interactions avec des partenaires qui peuvent inhiber l'activité enzymatique de l'ubiquitine-hydrolase ou au contraire l'activer (Kim et al., 2006) (McCullough et al., 2006)

- Une localisation cellulaire spécifique et nécessaire au fonctionnement de l'enzyme

Ces trois types de régulation peuvent aussi être combinés. A cela s'ajoute le fait que les dé-ubiquitinases sont spécifiques d'un ou plusieurs substrats grâce à l'architecture de leur site actif, comme par exemple AMSH qui est spécifique des chaînes d'ubiquitine liées par leur lysine 63.

III.4.2 Les ubiquitine-hydrolases impliquées dans les mécanismes en relation avec le système ESCRT

III.4.2.1 AMSH

Domaines et partenaires

AMSH, qui signifie « Molécule associée au domaine SH3 de STAM » (Associated molecule of the SH3 (SRC Homology 3 Domain) domain of STAM), a été découverte en 1999 par une équipe japonaise (Tanaka et al., 1999). Elle possède 5 régions qui lui permettent d'interagir avec d'autres protéines, de se localiser à différents endroits de la cellule ou d'avoir une activité enzymatique d'ubiquitine-hydrolase. Tout d'abord, l'extrémité N-terminale, est composée de 5 hélices- α qui se rassemblent en une structure allongée de 90Å de long. Les hélices- α 2, 3 et 4-5 forment un faisceau que l'on retrouve aussi dans VPS4 et qui est caractéristique d'un domaine MIT (figure 18). Ce domaine permet l'interaction avec les protéines CHMP1A, 1B, 2A et CHMP3 (Ma et al., 2007) (Row et al., 2007) (Tsang et al., 2006) (Zamborlini et al., 2006) (Agromayor and Martin-Serrano, 2006) (Solomons et al., 2011). Ensuite, AMSH possède une séquence de localisation nucléaire puis un domaine de liaison à la clathrine (CB). Ce dernier est à l'origine de l'interaction entre AMSH et la partie terminale de la chaîne lourde de la clathrine et cette liaison permet le recrutement d'AMSH à la membrane endosomale (Nakamura et al., 2006a). L'élément suivant est un motif RXXK situé dans la boucle flexible et centrale d'AMSH. Ce motif permet l'interaction avec le domaine SH3 de STAM1 et STAM2 (Sierra et al., 2010). Enfin, l'extrémité C-terminale est dotée d'un domaine JAMM qui est le cœur catalytique de cette enzyme et qui hydrolyse spécifiquement les liaisons isopeptidiques des ubiquitines liées par leur lysine K63 (Urbé et al., 2006) (Kim et al., 2006) (McCullough et al., 2006). Ce domaine est replié en une structure classique de domaine JAMM, avec un feuillet- β et un tonneau- β qui se mêlent et deux hélices- α qui les entourent (une dessus et une dessous) (figure 18). Deux insertions, caractéristiques d'AMSH, sont retrouvées entre les résidus 302 à 327 et 381 à 403 (Davies et al., 2011). Lorsque l'enzyme est rendue inactive par la mutation de résidus dans son site actif, il est possible d'observer l'enzyme liée à l'ubiquitine (McCullough et al., 2004) ce qui n'est pas le cas sans cette inactivation (Kim et al., 2006).

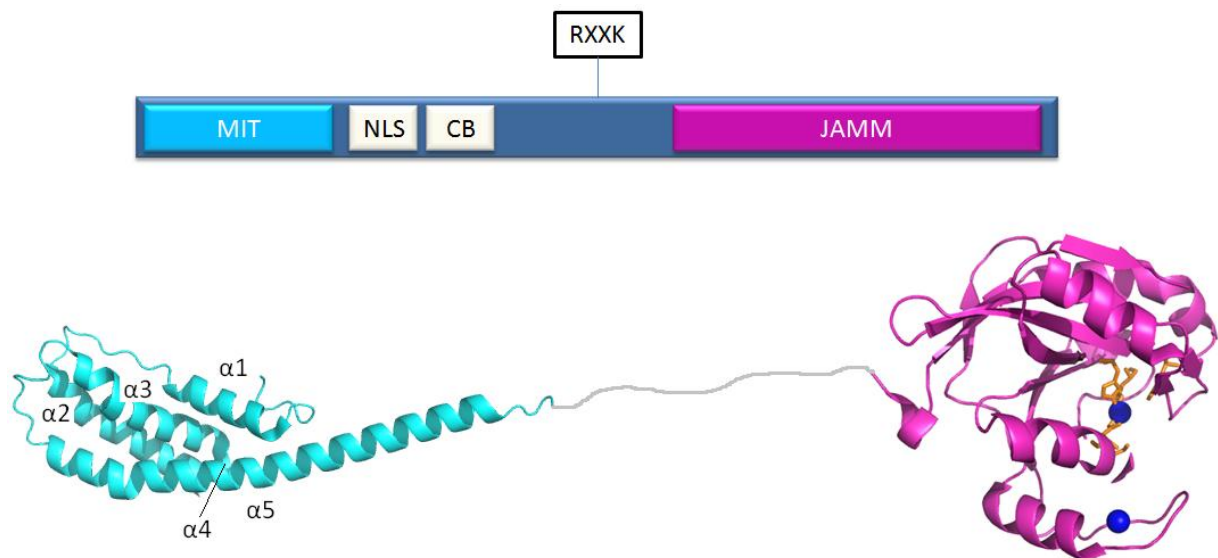


Figure 18 : Représentation schématique et structure d'AMSH. Bleu cyan : MIT : microtubule interacting and transport, NLS : séquence de localisation nucléaire, CB : Domaine de liaison à la clathrine, Violet : JAMM : Jab1/Mov34/Mpr1 Pad1 N-terminal+ (MPN+), les deux ions zinc sont représentés par des billes bleues et les résidus du site actif sont représentés en orange. (Codes PDB : AMSH N-ter : 2XZE AMSH C-ter : 3RZU)

Fonctionnement, spécificité et régulation

Le fonctionnement des dé-ubiquitinasés à domaine JAMM a d'abord été découvert pour AMSH-LP puis confirmé pour AMSH. En effet, les résidus catalytiques qui sont l'histidine 335, l'histidine 337, l'acide aspartique 348, l'acide glutamique 280 relié à une molécule d'eau et la sérine 345 pour AMSH sont conservés dans AMSH-LP. Ces résidus coordonnent un ion de zinc qui activera une molécule d'eau ce qui permettra l'attaque de la liaison isopeptidique (figure 19) (Sato et al., 2008) (Davies et al., 2011).

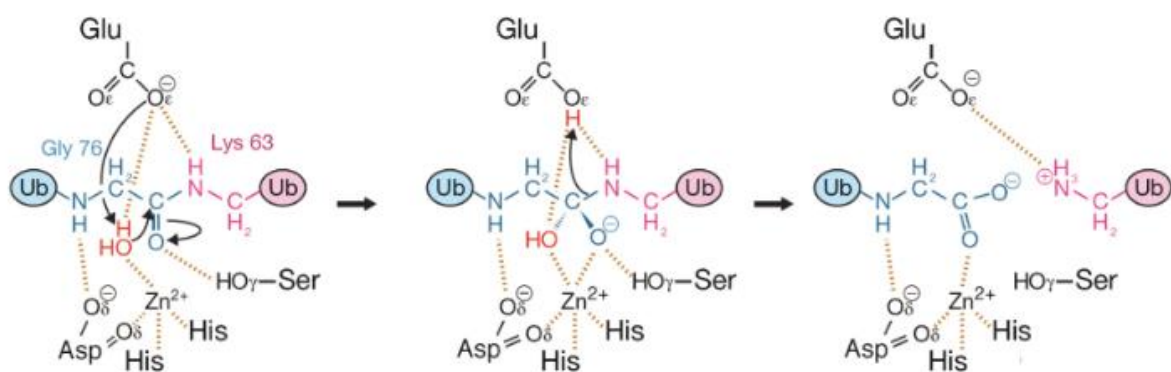


Figure 19 : Mécanisme de clivage de la liaison isopeptidique des chaînes d'ubiquitine liées par leur lysine K63 par AMSH et AMSH-LP. Ub : ubiquitine (Figure adaptée de Sato et al., 2008)

Le deuxième ion de zinc présent dans le domaine JAMM est coordonné par quatre résidus de l'insertion 2 et a un rôle structural. Il est important de noter que dans la structure de Davies et

al., le domaine catalytique d'AMSH est dans une conformation fermée et que les résidus Asp309 et Phe395 sont en contact et barrent ainsi l'accès au site actif. Il est donc possible qu'en se liant la polyubiquitine déplace ces résidus.

Enfin, il n'existe pas de structure d'AMSH en complexe avec l'ubiquitine mais la modélisation de cette interaction grâce à la superposition de la structure d'AMSH-LP liée à la di-ubiquitine K63 a permis d'obtenir plus d'informations à ce sujet. Il semblerait que l'ubiquitine proximale interagisse avec les résidus Phe 343, Phe 395 et Thr 341 d'AMSH via la glutamine 62 et l'acide glutamique 64 de façon similaire à ce qui est observé pour AMSH-LP. En ce qui concerne l'ubiquitine distale, le schéma d'interaction précis n'a pas pu être déterminé car les résidus impliqués dans cette interaction pour AMSH-LP ne sont pas conservés dans AMSH (Davies et al., 2011).

La régulation d'AMSH nécessite une combinaison des trois mécanismes cités précédemment. En effet, AMSH est elle-même ubiquitinée par le complexe RNF11/Smurf2 ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome 26S (Li and Seth, 2004). De plus, AMSH est majoritairement cytosolique ou nucléaire et n'est active que lorsqu'elle est recrutée à la membrane des endosomes ou à la membrane plasmique. Enfin, cette activation nécessite l'interaction avec la sous-unité STAM du complexe ESRT-0 et notamment le domaine SH3 mais le mécanisme de cette activation n'est pas encore connu (Kim et al., 2006) (McCullough et al., 2006).

Implication et rôle dans la voie endo-lysosomale

De par ces interactions avec les différentes protéines des complexes ESCRT, nous savons qu'AMSH est une des dé-ubiquitinases associées à cette machinerie dans la voie endo-lysosomale cependant son rôle reste à préciser. En effet, certaines publications montrent une augmentation de la dégradation d'EGFR quand AMSH est délétée alors que d'autre ont observé le phénomène inverse (McCullough et al., 2004) (Ma et al., 2007) (Meijer et al., 2012). De plus, cette enzyme intervient aussi dans la régulation de plusieurs récepteurs membranaires : le récepteur au calcium (CaR) (Reyes-Ibarra et al., 2007), les récepteurs couplés aux protéines G (Hislop et al., 2009) (Hasdemir et al., 2009) et le récepteur aux chémokines CXCR4 (Sierra et al., 2010). Enfin, la délétion d'AMSH ou des mutations au sein de sa séquence entraînent une accumulation de protéines ubiquitinées dans le système nerveux central qui sont à l'origine de maladies neurodégénératives (Suzuki et al., 2011) (McDonell et al., 2013). Cette protéine est donc profondément impliquée dans le système de dégradation des récepteurs membranaires via la voie endo-lysosomale mais son rôle exact reste méconnu.

Présence dans les autres mécanismes liés à la machinerie ESCRT

Il a été montré qu'une forme d'AMSH liée à une étiquette GFP à son extrémité N-terminale et co-exprimée avec CHMP3 dans des cellules 293T co-transfectées avec de l'ADN viral du VIH empêche le relargage des virions (Zamborlini et al., 2006). Cet effet n'est pas observé quand GFP-AMSH est exprimée seule dans ces mêmes cellules. Cette enzyme aurait donc un rôle de régulation de CHMP3 lors du bourgeonnement viral. Aussi, la déplétion d'AMSH bloque la cytokinèse et l'ubiquitine-hydrolase a été observée sur le site de division cellulaire au même endroit que les protéines CHMP (voir paragraphe I-1-2) (Mukai et al., 2008). Enfin,

une étude récente sur AMSH-1, appartenant à *Arabidopsis thaliana*, a montré que cette enzyme est aussi nécessaire dans l'autophagie chez les plantes (Katsiarimpa et al., 2013).

AMSH a donc une place très importante au sein de la voie endo-lysosomale mais aussi dans les autres mécanismes de scission membranaire dans lesquels les protéines ESCRT sont impliquées. Une plus grande compréhension de son mécanisme de régulation et de sa fonction précise apporterait de nouvelles informations concernant le fonctionnement global de ces processus cellulaires.

III.4.2.2 AMSH-LP

AMSH-like protein, ou AMSH-LP, a été découverte en 2003 lors de travaux portant sur le signalisation cellulaire initié par IL-2, réalisés par Kikuchi et al (Kikuchi et al., 2003). Ayant une séquence primaire très proche de celle d'AMSH (figure 20), elle contient aussi le signal de localisation nucléaire et le domaine catalytique JAMM qui hydrolyse spécifiquement les chaînes d'ubiquitine liées par leur lysine K63 (Nakamura et al., 2006b). Cependant, AMSH-LP n'est pas capable de lier STAM et aucune interaction avec les protéines CHMP n'a été observée à ce jour. Comme nous l'avons expliqué précédemment, AMSH-LP fonctionne de la même façon qu'AMSH et c'est grâce à la structure de son domaine catalytique que ce mécanisme a pu être dévoilé (Sato et al., 2008).

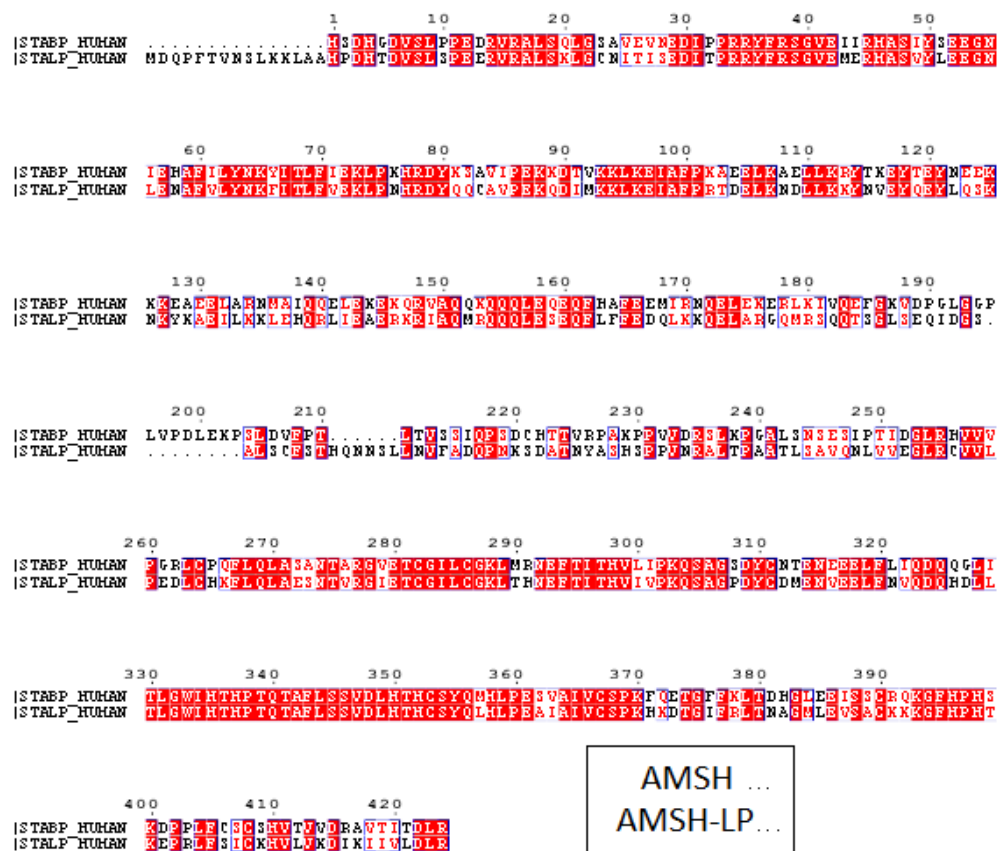


Figure 20 : Alignement des séquences primaires d'AMSH et AMSH-LP. Dessus : AMSH, Dessous : AMSH-LP. Boîte rouge : résidus conservés, Lettre rouge : résidus de même type.

III.4.2.3 UBPY

Domaines et partenaires

UBPY est composée de quatre domaines : un domaine MIT, situé à l'extrémité N-terminale, suivi d'un domaine homologue à la rhodanèse (RD), puis d'une région intermédiaire qui relie le domaine catalytique à l'extrémité C-terminale. Malgré leurs séquences primaires très différentes, le domaine MIT d'UBPY est similaire à celui d'AMSH et seule l'hélice- $\alpha 1$ est détachée des autres hélices ce qui forme une interface de dimérisation (figure 21) (Solomons et al., 2011) (Kaneko et al., 2003) cependant il n'a pas encore été démontré si cette dimérisation est nécessaire à l'activité d'UBPY *in vivo*. Ce domaine MIT est aussi capable d'interagir avec les protéines CHMP du complexe ESCRT-III et plus particulièrement CHMP1A, 1B, 4C et 7 mais aucune mesure d'affinité d'interaction entre ces protéines n'a été publiée à ce jour (Row et al., 2007) (Avvakumov et al., 2006). Les partenaires ESCRT-III d'UBPY et AMSH ne sont donc pas tous les mêmes et cela pourrait signifier que les interfaces d'interaction de leurs deux domaines MIT sont différentes. Le domaine homologue à la rhodanèse présent chez UBPY est un domaine inactif qui permet l'interaction entre protéines et notamment avec l'ubiquitine-ligase Nrdp1 (Avvakumov et al., 2006). Cette dernière entre aussi en contact avec le domaine catalytique d'UBPY ce qui entraîne sa déubiquitination. Enfin, la séquence primaire d'UBPY comporte trois motifs RXXK qui sont nécessaires à l'interaction avec la sous-unité STAM d'ESCRT-0 (Berry et al., 2002) (Kaneko et al., 2003) (Kato et al., 2000). C'est une interaction de faible affinité qui est de l'ordre d'une dizaine de μM (Berlin et al., 2010).

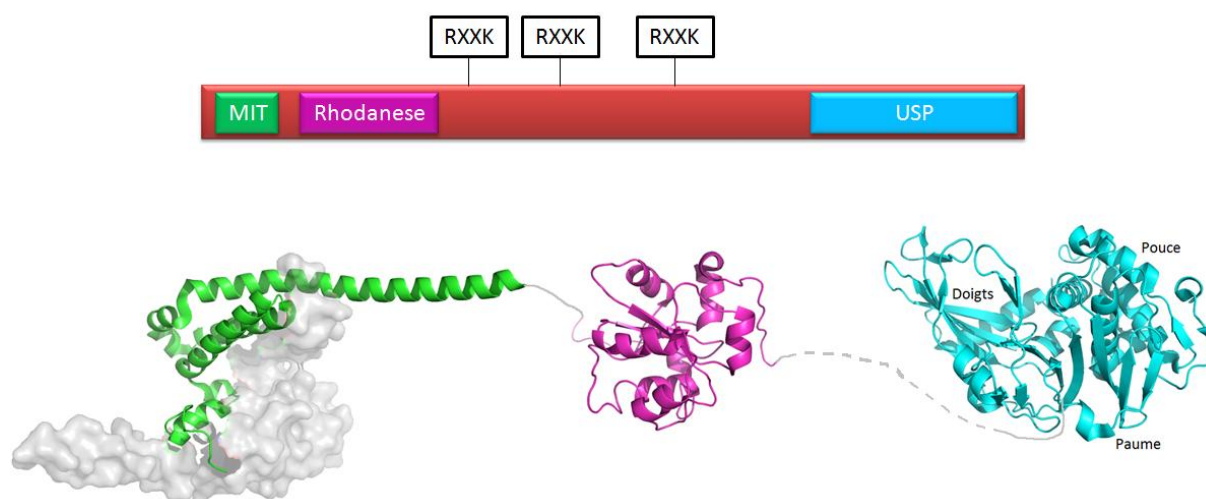


Figure 21 : Représentation schématique et structure des domaines d'UBPY. MIT : microtubule interacting and transport USP : Ubiquitin-specific processing proteases. RXXK : motif de liaison à STAM. (Code PDB : domaine MIT : 2A9U, Domaine rhodanèse : 1WHB, domaine USP : 2GFO).

Fonctionnement, spécificité et régulation

Le domaine catalytique d'UBPY est un domaine USP et adopte la même organisation que les autres membres de la famille USP (figure 16). La triade histidine-cystéine-asparagine est aussi située à l'interface entre le pouce et la paume et catalyse la réaction d'hydrolyse des liaisons isopeptidiques des chaînes liées par leur lysine K48 ou K63. Cette activité est dépendante de la liaison entre l'enzyme et la sous-unité STAM (Berlin et al., 2010)

Implication et rôle dans la voie endo-lysosomale

Les interactions entre UBPY et les protéines du système ESCRT montrent que cette enzyme a un rôle important dans la voie de dégradation des récepteurs membranaires. En effet, des études ont confirmé qu'UBPY agit directement sur la régulation négative des récepteurs à la tyrosine-kinase (ErbB3), à l'EGF (EGFR) et à l'HGF (HGFR) qui sont tous dégradés via la voie endo-lysosomale (Alwan and van Leeuwen, 2007) (Row et al., 2006). De plus, le blocage de l'expression d'UBPY entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et est létale pour des embryons de souris (Niendorf et al., 2007). Ceci souligne l'importance d'UBPY au sein de la cellule et indique que son rôle principal serait de dé-ubiquitiner les chargements qui entrent dans la voie endo-lysosomale.

Présence dans les autres mécanismes liés à la machinerie ESCRT

Il est important de noter qu'UBPY a aussi été observé lors de la cytokinèse (Mukai et al., 2008). Cependant, son action lors du bourgeonnement viral et de l'autophagie reste à démontrer.

IV. But et objectifs de la thèse

Le but général de ma thèse était d'étudier la régulation structurale de l'activité enzymatique de l'ubiquitine hydrolase AMSH.

Pour cela j'ai travaillé selon trois axes :

- L'étude de l'interaction entre AMSH et ses partenaires CHMP du système ESCRT-III :

Juliana Solomons avait auparavant cristallisé le complexe AMSH N-ter/ CHMP3 C-ter et mesuré son affinité d'interaction. J'ai poursuivi ce travail en confirmant par co-précipitation les résidus impliqués dans l'interaction de ce complexe et en mesurant l'affinité d'autres complexes entre AMSH et les protéines CHMP.

- La caractérisation structurale d'AMSH par des techniques biophysiques : cristallisation et diffusion de rayons X aux petits angles :

Au début de mon travail de thèse, seules les structures d'AMSH N-ter et de la partie C-terminale d'AMSH-LP étaient connues. J'ai donc concentré mes efforts sur l'amélioration du

protocole de purification d'AMSH et la cristallisation de sa forme entière afin de déterminer l'organisation spatiale et de pouvoir élucider la régulation de cette enzyme.

- L'étude de l'interaction d'AMSH avec la sous-unité STAM d'ESCRT-0 et ses conséquences sur l'activité enzymatique :

Les travaux précédents (Mc Cullough et al., 2005) (Kim et al., 2006) ont montré que la liaison de STAM à AMSH permettait son activation. Cependant, ceux-ci ont été réalisés uniquement pour un temps de réaction de 15 minutes au minimum et n'ont pas précisément déterminé les domaines de STAM nécessaires à cette activation. Afin d'affiner ces résultats et d'obtenir plus d'informations sur les domaines de STAM mis en jeu dans cette activation, j'ai réalisé des études cinétiques ainsi que des études d'interaction avec AMSH et différents domaines de STAM.

Matériel et Méthodes

I. Biologie moléculaire et biochimie des protéines

Nom	Construction	Vecteur	Référence
AMSH FI	1-424	pASK-IBA43(+)	Solomonset al., 2011
AMSH D348	1-424 + mutation D348A	pASK-IBA43(+)	Cloné par J. Solomons
AMSH link5	1-206 SGS GS 235-424	pASK-IBA43(+)	Clone personnel
AMSH EKE	1-424 + mutation E175A, K176A et E177A	pASK-IBA43(+)	Clone personnel
AMSH Nter 206	1-206	pBADM-41	Lata et al., 2008a
AMSH Nter 146	1-146	pProExHta	Cloné par J. Solomons
AMSH E72A, K88A, E104A, K107A	1-146 + mutation E72A, K88A, E104A ou K107A	pProExHta	Clones personnels Solomonset al., 2011
AMSH Cter	235-424	pBADM-41	Cloné par J. Solomons
CHMP1A Cter	123-196	pGEX-4T-3	Solomonset al., 2011
CHMP1B Cter	126-199	pGEX-4T-3	Solomonset al., 2011
CHMP3 FI	1-222	pProExHtb	Muziol et al., 2006
STAM SH3	200-261	pBADM-30	Clone personnel
STAM VUS (VHS-UIIM-SH3)	1-265	pBADM-30	Clone personnel
STAM UIIM-SH3	162-265	pBADM-60	Lange et al., 2012
UBPY Nter	8-138	pET28a-LIC	Addgène : plasmide 25224

Tableau 3 : Références du matériel biologique cité dans ce manuscrit

I.1 Clonage, expression et purification des différentes constructions d'AMSH

I.1.1 *AMSH FI*, *AMSH D348A*, *AMSH link5* et *AMSH EKE*

Les gènes d'AMSH (Associated Molecule of the SH₃ domain of STAM) humain sauvage, AMSH D348A, AMSH link5 ou AMSH EKE (figure 22) ont été clonés dans le vecteur d'expression bactérienne pASK-IBA43(+). Ces constructions ont ensuite été transformées dans des cellules *E.coli* BL21 Gold. Une pré-culture est utilisée pour inoculer chaque litre de milieu LB Miller. Ces cultures sont incubées à 37°C jusqu'à atteindre une densité optique (D.O₆₀₀) d'environ 0.5 puis la production de protéine est induite par l'ajout de 200 µg d'Anhydro tetracycline (AHT) par litre de culture, à 37°C pendant 3 heures. Après induction, les bactéries sont centrifugées à 6250 g pendant 15 minutes puis le culot resuspendu dans du tampon de lyse : 50 mM HEPES pH 8, 25 mM NaCl, 1 mM EDTA (si l'activité enzymatique ne doit pas être mesurée par la suite), (Tampon A). Les cellules sont ensuite lysées par sonication puis centrifugées 30 minutes à 48500 g. Le surnageant est déposé sur une colonne échangeuse d'anion Q sépharose préalablement équilibrée avec le tampon A. La protéine est éluée avec 50mL de tampon A contenant 50 mM de NaCl puis 50 mL de tampon A contenant 75 mM de NaCl. Ces fractions sont concentrées jusqu'à 1 à 2 mL puis mélangées avec un rapport 1 :1 avec 3 M de sulfate d'ammonium et incubées pendant 10 minutes à température

ambiante. Elles sont ensuite centrifugées 10 minutes à 4°C et à vitesse maximum d'une centrifugeuse de paillasse puis le culot est resuspendu dans 50 mL de tampon : 50 mM HEPES pH 8, 1 M NaCl, 1 M KCl, 1 mM EDTA. Cet échantillon est finalement déposé sur colonne de filtration sur gel S75 (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec du tampon 10 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA.

I.1.2 Méthylation des lysines d'AMSH Fl

La protéine AMSH Fl est purifiée comme décrit dans le paragraphe I.1.1 jusqu'à l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium puis resuspendue dans du tampon 50 mM HEPES pH7,6, 250 mM NaCl dans un volume tel que sa concentration soit inférieure à 1 mg.mL⁻¹. 20 µL de complexe diméthylamine-borane (ABC) 1 M fraîchement préparé et 40 µL de formaldéhyde 1 M sont ajoutés par millilitre de solution protéique puis cette solution est incubée 2h à 4°C sous agitation. Ensuite 20 µL d'ABC 1 M et 40 µL de formaldéhyde sont à nouveau ajoutés avant une seconde incubation de 2h à 4°C sous agitation. Enfin, 10 µL d'ABC complètent la réaction laissée à 4°C avec agitation toute une nuit. Le lendemain une dialyse de 4h dans un grand volume de tampon 20 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl est réalisée à 4°C, puis l'échantillon est concentré jusqu'à 500 µL et chargé sur une colonne de filtration sur gel S75 (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon utilisé pour la dialyse.

I.1.3 AMSH 206

Le gène correspondant à la partie N-terminale (1-206) d'AMSH humain (figure 22) a été cloné dans le vecteur d'expression bactérienne pBADM41 puis transformé dans des bactéries *E.coli* BL21. Une pré-culture incubée sur la nuit est utilisée pour inoculer un litre de milieu de culture TB (terrific broth) contenant : 1,2% de peptone, 2,4% d'extrait de levure, 0,4% de glycérol ainsi que 17 mM de KH₂PO₄ et 72 mM de K₂HPO₄. Les bactéries sont incubées à 37°C jusqu'à ce que la D.O₆₀₀ atteigne 1,2, puis elles sont induites par l'ajout de 1 mM d'IPTG et incubées à 18°C toute une nuit. Le lendemain le culot bactérien est récupéré par centrifugation 15 minutes à 6250 g et resuspendu dans du tampon B: 50 mM Tris, pH 8.5, 100 mM NaCl, 5 mM betamercaptoethanol. Les bactéries sont ensuite lysées par sonication puis l'extrait soluble est séparé des débris cellulaires par centrifugation 30 minutes à 48500 g. A cette étape le surnageant est conservé et chargé sur une colonne d'amylose pré-équilibrée avec le tampon B. La résine est abondamment lavée avec le même tampon puis la protéine est éluée avec du tampon B contenant 10 mM de maltose. Après une dialyse d'une nuit dans un tampon sans NaCl, une colonne HiTrap Q (GE Healthcare) est équilibrée avec du tampon C : 50 mM Tris pH 8.5, 50 mM NaCl et l'échantillon est chargé sur cette colonne puis élué avec un gradient linéaire de tampon D : 50 mM Tris pH 8.5, 500 M NaCl. La protéine est ensuite chargée sans concentration sur une colonne de filtration sur gel S75 (GE Healthcare)

préalablement équilibrée avec du tampon E : 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl , 3.4 mM EDTA. Cette étape est répétée plusieurs fois si nécessaire.

I.1.4 Mutagenèse dirigée d'AMSH 146 (1-146)

Les mutations E72A, K88A, E104A ou K107A sont introduites dans le gène d'AMSH 146 par la technique dite de « PCR chevauchantes ». Une première PCR est réalisée avec une amorce 5' contenant le site de restriction désiré ainsi que le début de la séquence du gène et une amorce 3' contenant la séquence du gène (environ 20 nucléotides) modifiée afin d'intégrer la mutation souhaitée. Une seconde PCR est effectuée avec une amorce 5' contenant la séquence du gène (environ 20 nucléotides) modifiée afin d'intégrer la mutation souhaitée et une amorce 3' contenant la fin de séquence du gène d'intérêt, un codon stop et le site de restriction choisi. Les produits de ces deux PCR sont ensuite utilisés pour servir de matrice lors d'une troisième PCR. Les amorces utilisées sont l'amorce 5' de la première PCR et l'amorce 3' de la deuxième PCR. Le produit de PCR est ensuite purifié par un kit d'extraction de gel (Quiagen) et cloné dans le vecteur pProExHTa.

I.1.5 His-AMSH 146 (1-146) sauvage , K88A, E104A ou K107A

Le gène correspondant à la partie N-terminale (1-146) d'AMSH humain sauvage ou avec les mutations décrites dans le paragraphe I.1.4 (figure 22) a été cloné dans le vecteur d'expression bactérienne pProExHTa puis transformé dans des cellules *E.coli* BL21. Une pré-culture d'une nuit est ensuite utilisée afin d'inoculer des litres de culture. Quand la D.O₆₀₀ atteint 0,4 l'expression de la protéine est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG puis poursuivie 5h à 18°C. Après induction, les bactéries sont centrifugées 15 minutes à 6250 g. Le culot est ensuite resuspendu dans du tampon 50 mM Tris pH 8,5, 100 mM NaCl, 400 mM Arginine en vue d'une lyse par sonication. Une nouvelle centrifugation 30 minutes à 48500 g permet de séparer les parties solubles et insolubles et le surnageant est déposé sur une colonne de résine de nickel pré-équilibrée avec du tampon de lyse. Ce tampon est aussi utilisé pour laver la résine et la protéine est éluée avec 300 mM d'imidazole. Elle est ensuite concentrée jusqu'à 500 µL pour être chargée sur une colonne de filtration sur gel S200 équilibrée avec du tampon : 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 400 mM Arginine.

I.1.6 AMSH C-ter (235-424)

Le gène correspondant à la partie C-terminale (235-424) d'AMSH humain (figure 22) a précédemment été cloné dans le vecteur pBAD41 puis introduit dans la souche BL21 gold d'*E.coli*. Une culture à 37°C est réalisée à partir d'une pré-culture et lorsque la D.O₆₀₀ atteint

0.6-0.7, l'expression est induite par 0.2% d'arabinose et poursuivie toute une nuit à 18°C. Les bactéries sont ensuite centrifugées 15 minutes à 6250 g afin de récupérer le culot et de le resuspendre dans du tampon de lyse : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM β mercaptoethanol (tampon F). Après une lyse par sonication, cette solution est centrifugée 30 minutes à 4800 g. Le surnageant est ensuite chargé sur une colonne d'amylose, pré-équilibrée avec du tampon F, puis lavé abondamment avec ce même tampon. Finalement AMSH C-ter est éluée avec du tampon F contenant 10 mM de Maltose. La prochaine étape de purification est une colonne échangeuse d'anion Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare). Celle-ci est équilibrée avec du tampon F et après dialyse d'une nuit dans du tampon sans NaCl, AMSH C-ter est chargée sur cette colonne puis récupérée dans ce qui est passé au travers, séparée de son étiquette MBP. Cet échantillon est ensuite concentré jusqu'à un volume de 2mL puis 500 μ L sont chargés sur colonne de filtration sur gel S75 (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec du tampon 10 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl.

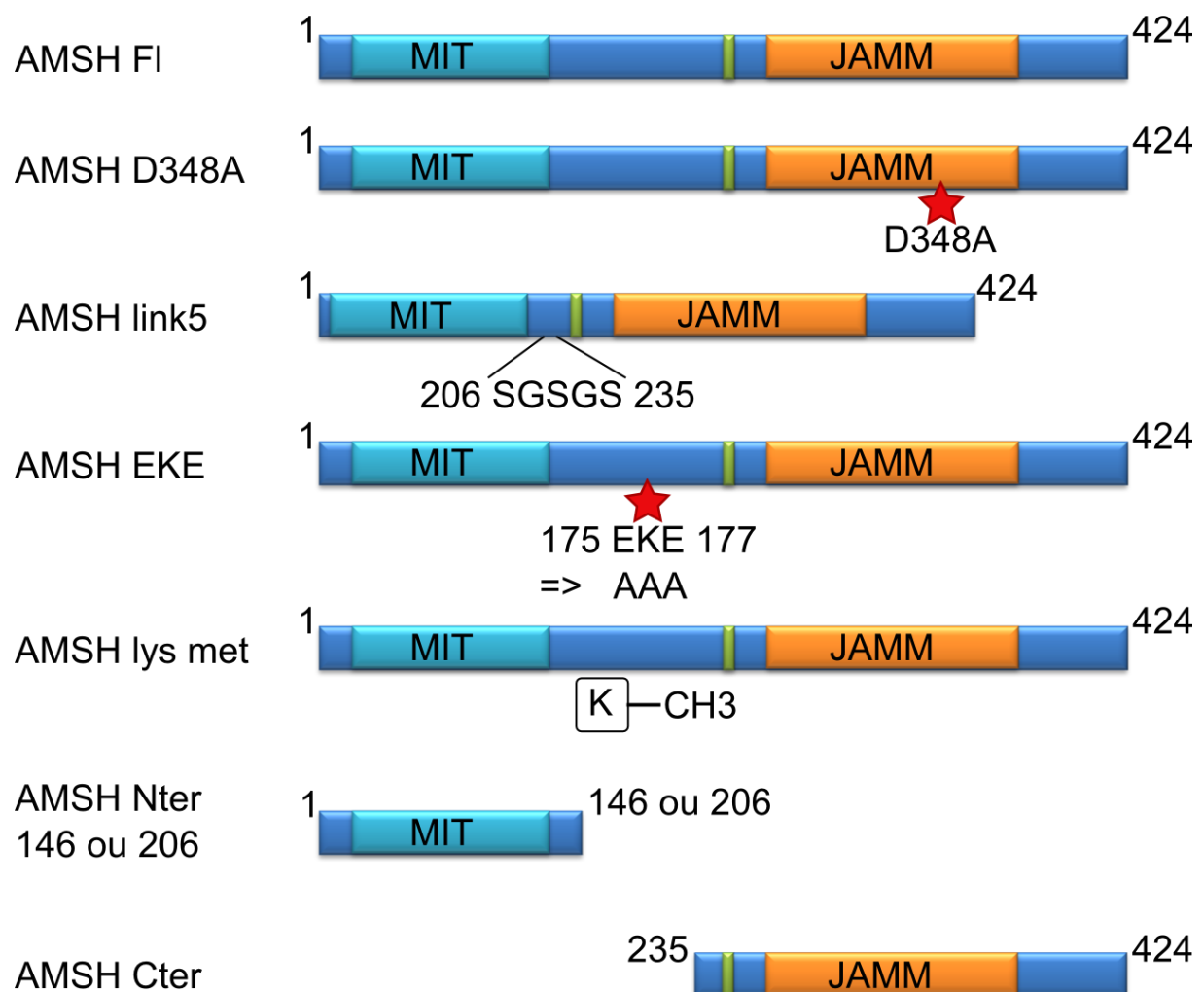


Figure 22 : Représentation schématique des différentes constructions d'AMSH étudiées

I.2 Clonage, expression et purification des différentes constructions des CHMP

I.2.1 CHMP1A C-ter (123-196) et CHMP1B C-ter (126-199)

Les gènes correspondants aux parties C-terminales de CHMP1A (123-196) et CHMP1B (126-199) ont été précédemment clonés dans le vecteur d'expression bactérienne pGex4T 3 (figure 23). Ces clones sont transformés dans des cellules *E.coli* BL21 puis une pré-culture est réalisée sur la nuit. Des litres de culture sont inoculés grâce à cette pré-culture puis incubés à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O.₆₀₀ de 0,5 environ, alors l'expression de la protéine est induite par 1 mM d'IPTG et les cultures sont incubées 3h à 37°C. Après induction, les bactéries sont centrifugées 15 minutes à 6250 g puis le culot est resuspendu dans du tampon de lyse (tampon G): 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. La lyse est réalisée par sonication puis l'extrait total est centrifugé 30 minutes à 48500 g afin de récupérer l'extrait soluble. Ce dernier est ensuite chargé à très faible débit sur une colonne de résine glutathion sépharose pré-équilibrée avec le tampon G. Un lavage abondant est réalisé avec du tampon de lyse puis l'étiquette GST est clivée directement sur la résine grâce à 1 volume colonne de tampon G contenant 0,01 Mg/ml de T.E.V. incubé toute une nuit sur la colonne à 4°C. La protéine est collectée le lendemain en éluant avec du tampon G. Cet échantillon est ensuite concentré jusqu'à 500 µL et chargé sur une colonne de filtration sur gel S75 (GE Healthcare) pré-équilibrée avec du tampon 10 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Comme ces protéines n'absorbent pas à 280nm, la fraction d'élution exacte ainsi que la concentration de l'échantillon sont estimées sur gel SDS-PAGE.

I.2.2 CHMP3 FI

La construction du gène CHMP3 FI cloné dans le vecteur pProExHTa est introduite dans des bactéries *E.coli* BL21 par transformation (figure 23). Une pré-culture est ensuite réalisée afin d'inoculer des litres de culture. Quand la D.O. atteint 0,5 l'expression de la protéine est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG puis poursuivie 3h à 37°C. Les bactéries sont ensuite centrifugées 15 minutes à 6250 g puis le culot est resuspendu dans du tampon de lyse (tampon H) : 20 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole. La lyse est effectuée par sonication puis l'échantillon est centrifugé 30 minutes à 48500 g. Le surnageant est récupéré pour être chargé sur une colonne de résine de nickel préalablement équilibrée avec du tampon A. Des lavages successifs avec le tampon A contenant : 1 M NaCl puis 1 M KCl et enfin 50 mM imidazole sont réalisés. Enfin la protéine est éluée avec du tampon A contenant 300 mM d'imidazole puis placée en dialyse contre un tampon sans imidazole sur la nuit en présence de 1% de T.E.V. (rapport molaire). Après cette étape l'échantillon est à nouveau chargé sur une colonne de résine de nickel pré-équilibrée avec le tampon A afin de collecter ce qui ne s'accroche pas à la résine. Par la suite, cet éluât est chargé sans concentration sur une colonne pré-équilibrée de filtration sur gel S75 (GE Healthcare) et éluée dans du tampon 20 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl.

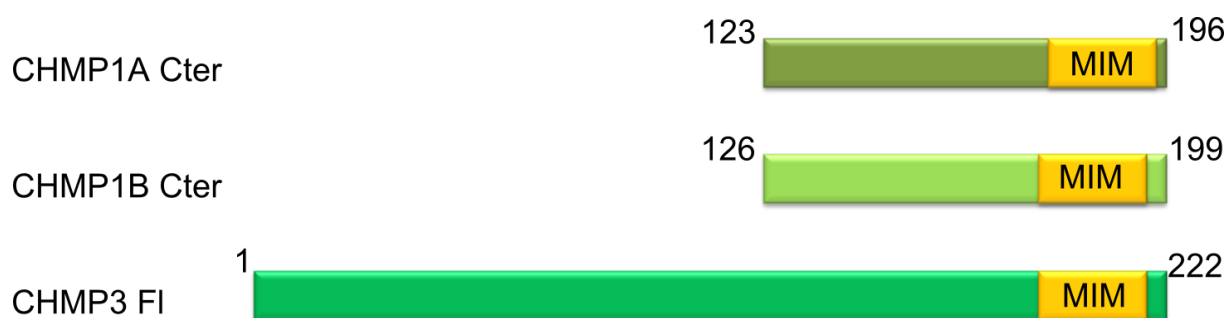


Figure 23 : Représentation schématique des différentes constructions de CHMP étudiées

I.3 Clonage, expression et purification des différentes constructions de STAM

I.3.1 STAM1 SH3 et STAM2 V.U.S.

Le gène correspondant au domaine SH3 de STAM1 (260-261) ainsi que celui correspondant aux domaines VHS-UIIM-SH3 de STAM2 (1-265) (figure 24) humain sont clonés dans le vecteur pBADM30 puis transformés dans des bactéries compétentes *E.coli* BL21. Une pré-culture d'une nuit est utilisée pour inoculer des milieux de culture. Ces cultures sont incubées à 37°C jusqu'à une D.O. de 0,5 environ puis l'expression de la protéine est induite par 0,02% (p/v) d'arabinose pendant 3h à 37°C. Après induction les bactéries sont centrifugées 15 minutes à 6250 g puis le culot est resuspendu dans du tampon de lyse : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. La lyse est réalisée par sonication puis le lysat cellulaire est centrifugé 30 minutes à 48500 g. Le surnageant est ensuite chargé à très faible débit sur une colonne de résine glutathion sépharose pré-équilibrée avec le tampon de lyse. La résine est lavée avec ce même tampon puis l'étiquette GST est clivée sur colonne grâce à 1 volume colonne de tampon contenant 0,01 mg. ml⁻¹ de protéase TEV incubé toute une nuit à 4°C. La protéine est éluée le lendemain avec du tampon de lyse. Cet échantillon est ensuite concentré jusqu'à 500 µL et chargé sur une colonne de filtration sur gel S75 (GE Healthcare) pré-équilibrée avec du tampon 10 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl.

I.3.2 STAM2 UIIM-SH3

Le gène correspondant aux domaines UIIM-SH3 (162-265) de STAM2 humain (figure 24) a été précédemment cloné dans le vecteur petM60 par l'équipe du Dr. Olivier Walker. Après transformation dans des cellules compétentes *E.coli* BL21 une pré-culture a été incubée une nuit à 37°C afin d'inoculer des litres de culture. Après culture à 37°C jusqu'à une D.O₆₀₀ de 0,8, l'expression protéique est induite par 1 mM d'IPTG puis les cultures sont placées à 30°C sous agitation pendant 5h. Les bactéries sont ensuite centrifugées 15 minutes à 6250 g puis le

culot est resuspendu dans du tampon de lyse : 50 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl. Les cellules sont lysées par sonication puis centrifugées 30 minutes à 48500 g. Le surnageant est ensuite chargé sur une colonne de résine de nickel équilibrée auparavant avec du tampon de lyse. Ce tampon permet aussi de laver la résine avant d'éluer la protéine avec 50 mM d'imidazole. L'étiquette hexa-histidine-NusA est clivée par l'ajout de TEV à un rapport molaire de 1 :100 et l'imidazole est dialysé toute une nuit à 4°C. Le lendemain une deuxième colonne de nickel est réalisée pour séparer l'étiquette de la protéine et l'échantillon protéique non retenu par la résine est concentré jusqu'à 500 µL puis chargé sur colonne de filtration sur gel S75 (GE Healthcare) pré-équilibrée avec du tampon 10 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl.

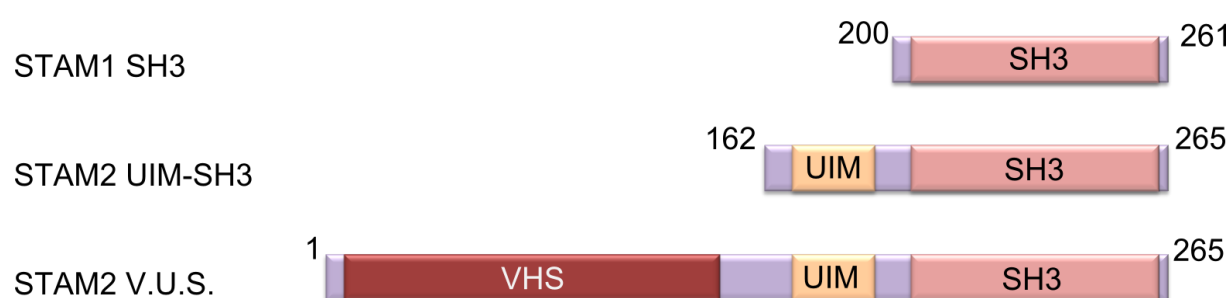


Figure 24 : Représentation schématique des différentes constructions de STAM étudiées

I.4 Expression et purification d'UBPY N-ter (8-138)

Le clone 2A9U (Addgene) contenant la partie N-terminale d'UBPY (8-138) dans le vecteur pET28a est transformé dans des cellules compétentes *E.coli* BL21 gold puis des litres de cultures sont inoculés avec une pré-culture d'une nuit. Lorsque la D.O. atteint 0,5 environ, l'expression de la protéine est induite par 1 mM d'IPTG et poursuivie 3h à 37°C. Après induction, les cellules sont centrifugées 15 minutes à 6250 g et le culot est resuspendu dans du tampon de lyse (tampon I) : 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl. Une lyse bactérienne est réalisée par sonication puis l'échantillon est centrifugé 30 minutes à 48500 g. Le surnageant est ensuite chargé sur une colonne de résine de nickel équilibrée avec le tampon de lyse. Des lavages successifs sont réalisés avec le tampon I, le tampon I contenant 1 M NaCl, puis 1 M KCl et enfin 50 mM d'imidazole. L'échantillon est ensuite concentré jusqu'à environ 1,5mL puis 500 µL sont chargés sur une colonne de filtration sur gel S75 (GE Healthcare) pré-équilibrée avec du tampon : 10 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl.

II. Méthodes de caractérisation structurale des protéines

II.1 Cristallogénèse et introduction à la cristallographie

II.1.1 Principe

La cristallographie est une technique qui permet d'obtenir des informations structurales d'un arrangement périodique et régulier de molécules identiques: le cristal. Lorsque ce cristal est composé de protéines nous utilisons un rayonnement de longueur d'onde comparable à celle d'une liaison carbone-carbone, c'est-à-dire de l'ordre de l'Angström: les rayons X. Pour appliquer la méthode de cristallographie aux rayons-X il faut donc dans un premier temps obtenir des cristaux par cristallogénèse. La cristallogénèse consiste à placer une solution protéique extrêmement pure dans des conditions particulières (sels, concentration de protéine, pH, autres agents précipitants) qui évoluent lentement et permettent l'organisation de la protéine sous forme cristalline. La solution traverse alors différentes phases représentées dans la figure 25, le but étant que la protéine entre dans une phase de nucléation puis de croissance afin de former un cristal.

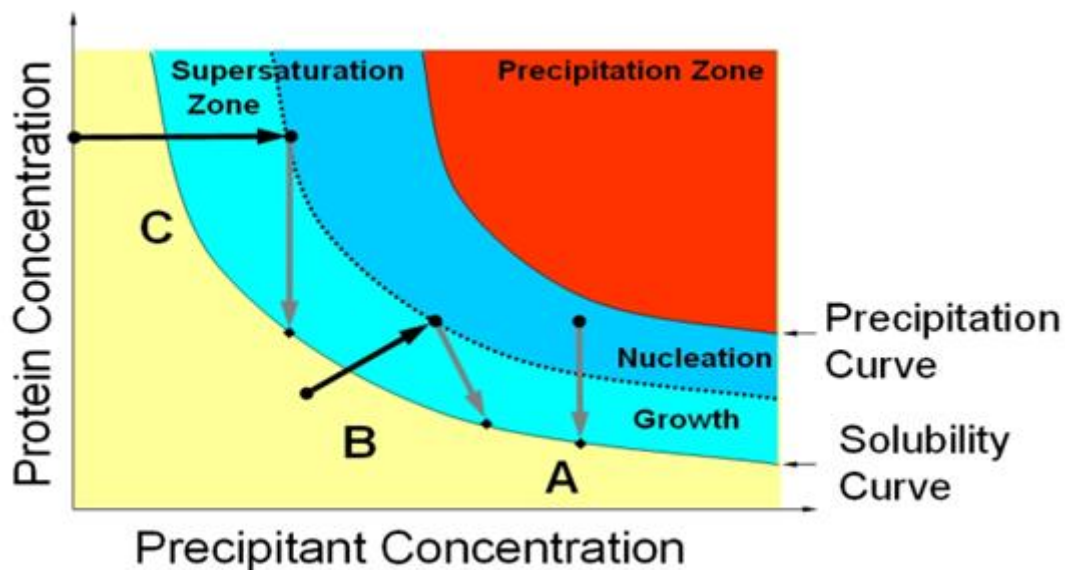


Figure 25 : Diagramme de phases traversées par une protéine lors de la cristallogénèse. A : cristallogénèse de type bain, la protéine est directement mélangée à la solution d'agents précipitants. B : cristallogénèse par diffusion de vapeur, la protéine est mélangée aux agents précipitants et est placée dans un environnement hermétique contenant un réservoir de solution d'agents précipitants. C : cristallogénèse en bouton de dialyse, la protéine est placée en dialyse dans une solution d'agents précipitants.

Lors de ces travaux la méthode choisie est la cristallogénèse par diffusion de vapeur.

II.1.2 Techniques utilisées

Comme mentionné précédemment la méthode utilisée pour la cristallogenèse des différentes formes d'AMSH est la diffusion de vapeur. Celle-ci peut être mise en place selon deux techniques: la goutte suspendue ou la goutte assise (figure 26).

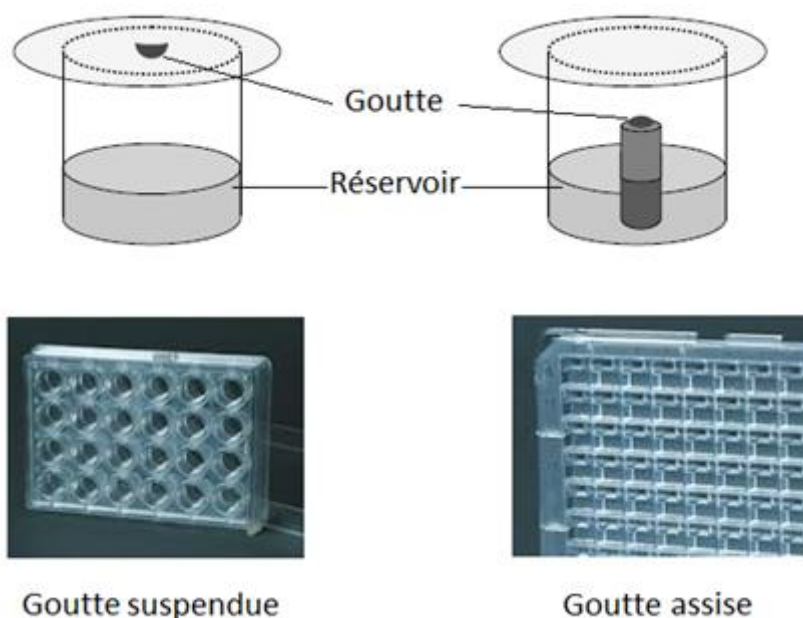


Figure 26 : Techniques de cristallogenèse par diffusion de vapeur en goutte assise et goutte suspendue. Photos Hampton research.

Le principe de ces deux techniques reste le même mais dans un cas la goutte est suspendue au dessus du réservoir, maintenue sur une lamelle de verre traitée, alors que dans l'autre elle est déposée sur un promontoire.

II.1.3 Conditions expérimentales

Les protéines AMSH D348A, AMSH Fl, AMSH lys met, et les complexes d'AMSH Fl avec CHMP3 Fl ou STAM V.U.S. sont concentrés de 1 à 15mg.ml⁻¹ et confiées à la plateforme de cristallisation à haut débit de l'EMBL. Les essais de cristallisation utilisent la technique de diffusion de vapeur en goutte assise et couvrent 576 conditions. Les images prises par un robot Formulatrix RockImager (Formulatrix, Inc., U.S.) à 20°C et sur un intervalle de 24h à 87 jours après la mise en place de l'expérience sont ensuite analysées et les conditions les plus prometteuses sont reproduites et affinées à la main, avec la technique de diffusion de vapeur en goutte suspendue.

II.2 Diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)

II.2.1 Principe

La diffusion de rayon X aux petits angles (SAXS) permet d'obtenir des informations concernant la forme et la taille de l'objet en solution mais ne nécessite pas de cristaux de protéine. Ces informations à basse résolution sont obtenues grâce à la diffusion des rayons X par les molécules (protéines par exemple) d'une solution homogène très diluée et dans laquelle les particules n'interagissent pas entre elles. On définit alors le vecteur de diffusion q :

$$q = 4\pi \sin\theta / \lambda \quad (1)$$

avec λ la longueur d'onde du rayon incident et 2θ l'angle de diffusion. Cette diffusion est enregistrée aux petits angles ($0,1-10^\circ$) sous forme d'un cliché de diffusion (figure 27). Après mesure du signal, les intensités obtenues pour le tampon sont soustraites à celles enregistrées pour la solution protéique afin d'obtenir des informations concernant la protéine uniquement. Les données sont ensuite traitées grâce à différents logiciels décrits par la suite et il est alors possible de calculer le rayon de giration R_g , la fonction de distribution des distances $P(r)$, le diamètre maximum D_{max} , ainsi que d'estimer la masse moléculaire en solution grâce à la relation avec $I(0)$:

$$MM_p = I(0)_p / c_p * (MM_{st} / (I(0)_{st} / c_{st})) \quad (2)$$

où $I(0)_p$ et $I(0)_{st}$ sont les intensités de diffusion à l'angle 0, MM les masses moléculaires, et c les concentrations, avec p pour protéine d'intérêt et st pour protéine standard.

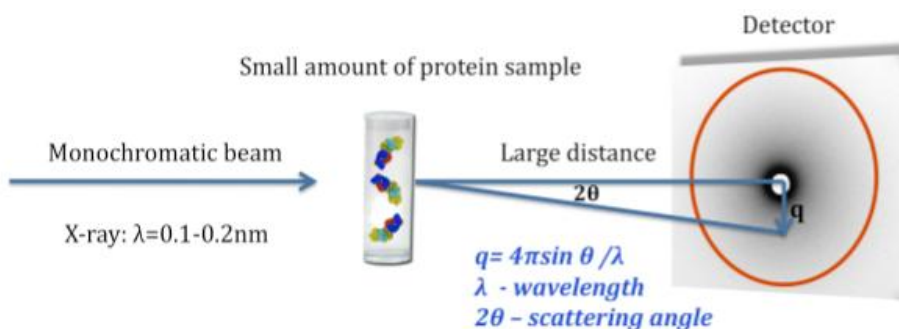


Figure 27 : Montage permettant de mesurer la diffusion de rayons X aux petits angles.
<http://www.cgl.ucsf.edu/Research/sali/>

II.2.2 Conditions expérimentales

Les protéines AMSH Fl et CHMP3 Fl sont purifiées seules ou en complexe comme décrit précédemment dans les paragraphes I.1.1, I.2.2 et III.1.1. Pour chaque échantillon des mesures sont collectées sur la ligne de lumière BM29 de l'ESRF Grenoble, à une longueur d'onde de $1,008 \text{ \AA}$ à trois concentrations différentes : AMSH Fl : $1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, 1 mg.ml^{-1} et $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$; CHMP3 Fl : $2,1 \text{ mg.ml}^{-1}$, 1 mg.ml^{-1} et $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$; Complexe : $1,2 \text{ mg.ml}^{-1}$, 1 mg.ml^{-1} et $0,6 \text{ mg.ml}^{-1}$, et à 20°C . Chacune des concentrations, y compris le témoin négatif,

est exposée 10 fois 2 secondes puis les données 2D sont transformées en données 1D par la procédure mise en place sur la ligne de lumière. Des courbes moyennes sont alors calculées et ce sont ces courbes qui sont utilisées pour les analyses suivantes.

II.2.3 Traitement et analyse des données

Réduction des données :

Le programme PRIMUS (Konarev et al. 2003) est utilisé pour visualiser et analyser les courbes 1D. Les courbes correspondant au tampon sont soustraites à celles correspondant aux échantillons. Ensuite les données à différentes concentrations sont comparées, si elles sont superposables et si pour la concentration la plus haute la protéine n'est pas agrégée, alors la courbe de l'échantillon le moins concentré est conservée pour les petits angles et est combinée avec la courbe de l'échantillon le plus concentré pour les grands angles. Le rayon de giration (R_g) et la diffusion $I(0)$ sont calculés grâce à l'approximation de Guinier aux petits angles (q) : pour $q.R_g < 1,5$

$$\ln I(q) = \ln I(0) - (R_g^2 q^2 / 3) \quad (3)$$

La fonction de distribution des distances $P(r)$ et le rayon de giration sont ensuite calculés avec le programme GNOM (Svergun, 1992) et la dimension maximale de la molécule (D_{max}) est ajustée afin que les rayons de giration obtenus avec l'approximation de Guinier et GNOM correspondent (Guinier, 1939).

Modélisation Ab initio d'AMSH FI :

Les programmes DAMMIN (Svergun, 1999) et DAMMIF (Franke, Svergun, 2009) sont utilisés pour construire plusieurs modèles ab initio. Une grande sphère de diamètre D_{max} est remplie de pseudo-atomes modélisés sous la forme de petites sphères dont la position est affinée grâce à une procédure de recuit simulé. La modélisation est ensuite poursuivie avec le programme BUNCH (Petoukhov and Svergun, 2005) qui utilise aussi un procédé de recuit simulé pour trouver les positions et les orientations optimales des structures à haute résolution disponibles ainsi que pour modéliser la conformation des atomes manquants sous forme de chaînes de résidus simulés. Le modèle optimal final doit être en accord avec les données expérimentales.

Validation du modèle obtenu par diffusion des rayons X aux petits angles :

Il existe plusieurs façons de s'assurer de la cohérence des données et de la modélisation ab initio. Tout d'abord la représentation graphique de la région de Guinier : $\log(I(q))$ en fonction q^2 doit être linéaire et qR_g ne doit pas dépasser 1,3. Ensuite, il ne doit pas y avoir d'augmentation des valeurs de R_g ou $I(0)$ quand la concentration augmente, cela traduirait une multimérisation de la molécule en solution. De plus, il est aussi possible de vérifier qu'il n'y a pas de répulsion entre les particules en solution en s'assurant que l'intensité aux petits angles ne diminue pas quand la concentration de l'échantillon augmente (Putnam et al., 2007). Enfin, l'erreur calculée pour le R_g et le $I(0)$ ne doit pas être supérieure à 5%. En ce qui

concerne la modélisation *ab initio*, pour chaque modèle proposé une valeur statistique de corrélation entre les données expérimentales et le modèle est calculée. Cette valeur est appelée « chi » et plus elle est basse, plus le modèle est en accord avec les données expérimentales. En pratique, une valeur proche de 1 est acceptée.

III. Etudes des interactions inter-protéiques

III.1 Co-purification et co-précipitation

III.1.1 Co-purification AMSH FI/ CHMP3 FI

Les protéines AMSH FI et CHMP3 FI sont purifiées comme décrit dans les paragraphes I.1.1 et I.2.2. Elles sont ensuite mélangées avec un excès de CHMP3 FI (rapport molaire 1:3) puis concentrées jusqu'à 500 µL afin de purifier le complexe sur une colonne de filtration sur gel S75 (GE Healthcare) pré-équilibrée avec le tampon 20 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl.

III.1.2 Co-précipitation

30 µL de billes de résine glutathion sépharose sont lavés deux fois avec 1 mL de tampon A : 50 mM Tris pH 8,5, 100 mM NaCl, 0,01% Triton puis 10 µg de protéine de fusion avec l'étiquette GST (GST-CHMP1A C-ter ou GST-CHMP1B C-ter) sont incubés pendant 1h à température ambiante et agités par une roue. Les billes sont ensuite lavées deux à trois fois avec le tampon A puis 100 µL de BSA à 10 mg.mL⁻¹ sont ajoutés et incubés 10 minutes à température ambiante afin de bloquer les billes. La résine est à nouveau lavée puis 20 µg de la protéine proie (AMSH 146 sauvage ou muté) sont ajoutés et incubés 1h dans les mêmes conditions que précédemment. Quatre à cinq lavages de 10 minutes avec le tampon A sont effectués puis les protéines fixées par la résine sont éluées avec 30 µL de bleu de charge amené à ébullition. Finalement, un gel SDS-PAGE est réalisé afin de visualiser les résultats.

III.2 Résonance plasmonique de surface (SPR)

III.2.1 Principe

La résonance plasmonique de surface est une méthode qui permet de déterminer l'affinité d'interaction entre deux molécules, l'une attachée (ligand) sur une fine surface d'or et l'autre écoulée (analyte) sur cette surface dans un fluide continu. Le phénomène de résonance plasmonique de surface a lieu quand une lumière polarisée est dans des conditions de réflexion totale et qu'elle heurte la surface conductrice (or) à l'interface entre la plaque de

verre de la puce et le liquide écoulé. Alors un champ électrique est créé: l'onde évanescente. Celle-ci interagit avec la couche d'or ce qui génère des ondes de charges électriques appelées plasmons. Ces plasmons réduisent l'intensité de la lumière réfléchiée mesurée par le système de détection. L'angle auquel l'intensité est la plus faible dépend de l'indice de réfraction de la solution attenante à la couche d'or. Cet indice sera modifié par l'interaction ou non des deux protéines d'intérêt (figure 28).

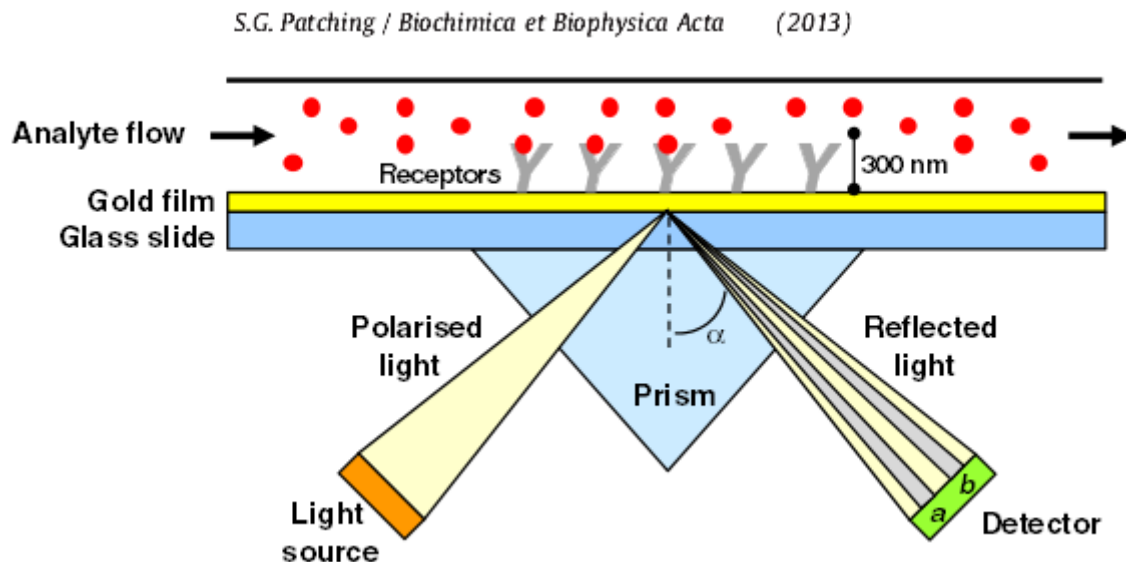


Figure 28 : Illustration des composants d'un système de mesure des résonances plasmonique de surface. (Patching, 2013)

Tout au long de l'expérience l'appareil mesure les changements de signal et les retranscrit sous forme de sensogramme. Quand une molécule lie la surface de la puce, le signal augmente et quand cette molécule se détache le signal diminue. Nous pouvons ainsi observer sur le sensogramme des phases d'association et des phases de dissociation. L'analyse des courbes permettra ensuite d'obtenir des paramètres cinétiques comme la constante d'association (k_{on} ou k_a) ou la constante de dissociation (k_{off} ou k_d) et de calculer la constante d'affinité (K_D) de l'interaction étudiée avec :

$$K_D = k_{off}/k_{on} = [\text{ligand}][\text{analyte}]/[\text{complexe ligand-analyte}] \quad (4)$$

avec $[X]$ la concentration des protéines (figure 29).

A la fin de l'expérience l'analyte peut être décroché grâce à différentes solutions de régénération (bas/haut pH, haute concentration en sel, détergent) et la puce contenant le ligand peut être réutilisée. Cette technique a l'avantage de pouvoir mesurer des interactions dans une fourchette très large (nM-mM) en utilisant des échantillons de faible volume et à basse concentration.

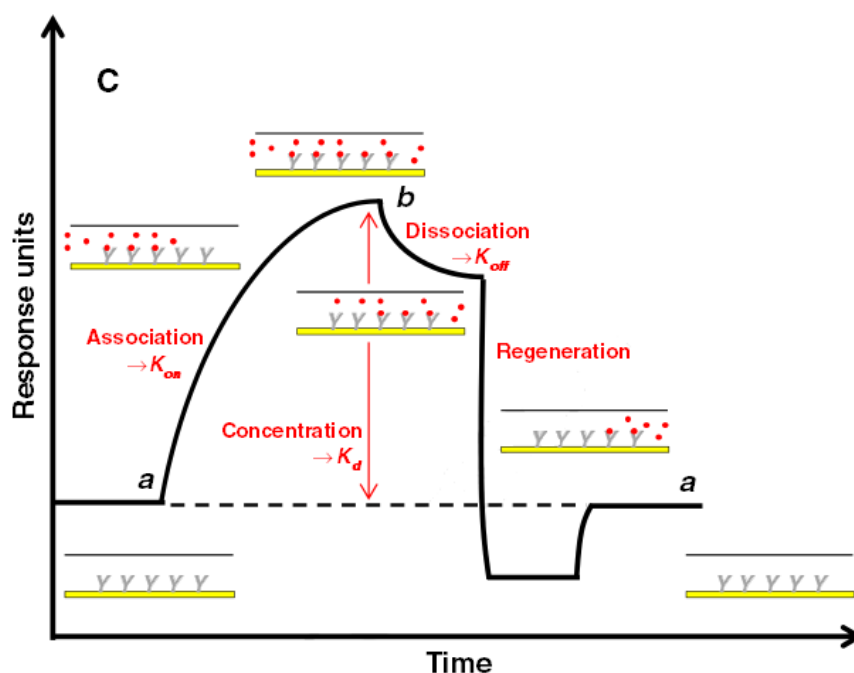


Figure 29 : Schéma représentant un sensogramme classique des différentes phases visualisées en SPR. (GE Healthcare-Biacore)

III.2.2 Conditions expérimentales

AMSH D348A et STAM2 V.U.S

Les protéines sont purifiées comme décrit dans les sections I.1.1 et I.3.1 puis dialysées dans du tampon J : 10 mM HEPES pH7,6, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,005% surfactant P20. La fixation du ligand sur la puce est covalente grâce à un couplage amine. A l'aide d'un système Biacore® 3000, la surface des deux premières cellules (« Flow cell » : Fc₁ et Fc₂) d'une puce CM5 (GE Healthcare) est activée par l'injection de 50 µL d'un mélange équimolaire d'EDC et NHS à un flux de 10 µL.min⁻¹. Le ligand, ici AMSH D348A, est dilué 200 fois (concentration finale = 50 nM) dans du tampon 10 mM d'acétate de sodium pH 4,5 et est attaché de façon covalente sur Fc₂. Les deux surfaces sont ensuite inactivées par injection de 50 µL d'éthanolamine 1 M à un flux de 10 µL.min⁻¹. Au final, le signal de fixation d'AMSH sur la puce correspond à environ 2700 RU (unité de réponse arbitraire). La suite de l'expérience est réalisée dans du tampon J. Après injection de l'analyte (STAM2 V.U.S.) à 4500 nM, différentes solutions de régénération sont testées et la solution retenue est le tampon J contenant 0,015% de SDS. Les concentrations d'analyte varient de 750 à 9000 nM et le flux est fixé à 10 µL.min⁻¹, le temps d'injection est de 5 minutes et le temps de dissociation de 15 minutes. Les mesures sont réalisées de façon aléatoire par rapport à la concentration de l'analyte. Un contrôle négatif est enregistré en écoulant seulement du tampon J et deux concentrations sont réalisées en duplicat.

AMSH Fl et STAM2 UIM-SH3

Les protéines sont purifiées comme décrit dans les sections I.1.1 et I.3.2 puis dialysées dans du tampon J. La même procédure que précédemment est utilisée pour fixer le ligand, AMSH Fl, qui est diluée 100 fois (concentration finale = 720 nM) dans du tampon 10 mM d'acétate de sodium pH 4,5. Au final, le signal de fixation d'AMSH Fl sur la puce correspond à environ 9300 RU. La suite de l'expérience est réalisée dans du tampon J. A la fin de l'injection de l'analyte (STAM2 UIM-SH3) à 7500 nM, le signal revient au niveau de base, il n'y a donc pas besoin de solution de régénération. Une série de mesures est ensuite réalisée pour des concentrations d'analyte variant de 750 à 7500 nM, le flux est fixé à 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, le temps d'injection est de 5 minutes et le temps de dissociation de 10 minutes. Les mesures sont réalisées de façon aléatoire par rapport à la concentration de l'analyte. Un contrôle négatif est enregistré en écoulant seulement du tampon J et deux concentrations sont réalisées en duplicat.

III.2.3 Traitement et analyse des données

Les données sont traitées avec le logiciel BIAevaluation 3.0 (Biacore®). L'analyse s'effectue sur les courbes pour lesquelles le bruit enregistré grâce à Fc1 est soustrait, c'est-à-dire celles reportées sur le sensogramme Fc₂-Fc₁. Les courbes sont tout d'abord alignées selon les axes x et y puis tout ce qui ne correspond pas à la phase d'association ou de dissociation est supprimé. La courbe correspondant au contrôle négatif est soustraite à toutes les autres courbes afin d'annuler l'effet du tampon sur l'enregistrement. La fonction « fit global » est ensuite utilisée pour superposer au mieux le modèle cinétique théorique langmuir 1 :1 aux données expérimentales et calculer les paramètres cinétiques (k_{on} , k_{off} et le K_D).

La bonne superposition du modèle aux courbes expérimentales est contrôlée de trois façons : visuellement, en s'assurant qu'il n'y ait pas d'aberrations pour certaines parties des courbes, statistiquement, en obtenant une valeur du test χ^2 inférieure 5% du Rmax (capacité de liaison maximum du ligand) et en observant les écarts résiduels qui doivent idéalement être compris entre -2 et 2.

IV. Etude de l'activité enzymatique d'AMSH

IV.1 Etude par gel SDS-PAGE

IV.1.1 Production de la di-ubiquitine liée par la lysine K63

Cette production a été réalisée par le Dr. Ivan Ivanov de l'équipe du Dr. Stephen Cusack à l'EMBL selon le protocole décrit par Dong et al., 2011.

IV.1.2 Conditions expérimentales

AMSH Fl ou AMSH C-ter ainsi que STAM UIM-SH3 et STAM V.U.S. sont purifiées comme expliqué dans les paragraphes précédents. Les réactions de dé-ubiquitination sont réalisées à température ambiante dans du tampon : 50 mM Tris pH7,4 , 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,2mM DTT et le volume final est de 200 µL. AMSH seule (1 µM) ou en complexe avec son activateur (1 µM) est incubée dans du tampon de réaction avec un excès de di-ubiquitine (13 µM) et une étude cinétique est réalisée en prélevant 20 µL d'échantillon à partir de 30 secondes et jusqu'à 30 minutes. La réaction est stoppée par l'ajout de 10 µL de bleu de charge laemli et les échantillons sont immédiatement placés à -20°C. A la fin de la cinétique, les échantillons sont placés 5 minutes dans un bloc à 95°C puis chargés sur un gel SDS-PAGE Tris Glycine 18%. La révélation est faite par une coloration au bleu de coomassie. Les expériences sont réalisées en triplicat.

IV.1.3 Traitement et analyse des intensités de bandes: ImageJ

L'intensité des bandes provenant des gels SDS-PAGE précédents est étudiée grâce au logiciel de traitement d'image : ImageJ. Les bandes sont sélectionnées individuellement et l'aire correspondant à l'intensité de chaque pic est ensuite normalisée avec pour référence 100% la bande à t=0. La moyenne des valeurs de chaque expérience est ensuite calculée et reportée dans un graphique en fonction du temps.

IV.2 Analyse par mesure de fluorescence

Les protéines AMSH Fl et STAM VUS sont purifiées comme indiqué dans les paragraphes I.1.1 et I.3.1 en prenant soin de ne pas ajouter d'EDTA pour la purification d'AMSH. Les expériences sont ensuite réalisées au CEA de Grenoble, avec l'aide de Caroline Barette, de l'équipe du Dr. Marie-Odile Fauvarque, sur un spectrophotomètre Infinite M1000 (Tecan Group Ltd) aux longueurs d'onde d'excitation de 540 nm et d'émission de 580. Une plaque Greiner à fond noir de 96 puits est ensuite utilisée pour préparer les échantillons et prendre les mesures. Les puits sont composés de tampon : 50 mM HEPES pH 8, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 % (v/v) de glycérol, 0,2 mg.mL⁻¹, 1 mM DTT, ainsi que 200 nM de di-ubiquitine K63 fluorescente commerciale (LifeSensors Inc.). Selon les cas les puits contiennent aussi l'activateur STAM VUS à 10 ou 100 nM. AMSH Fl est ensuite injectée par l'appareil de sorte à ce que sa concentration finale soit de 10 ou 100 nM. Les échantillons sont agités 10s avant le début des mesures. Les valeurs sont enregistrées en duplicat et sont ensuite reportées sur un graphique grâce au logiciel Excel (Microsoft).

Résultats

I. Etude de l'interaction entre AMSH ou UBPY et les protéines CHMP

La liaison entre les domaines MIM et les domaines MIT a un rôle important dans les interactions entre protéines au sein de la machinerie ESCRT. Par exemple, il a été démontré que VPS4 ou la spastine sont recrutées lors de la cytokinèse via leur interaction avec, respectivement, IST1 et CHMP1A ou CHMP1B (Bajorek et al., 2009a) (Yang et al., 2008). De plus, Kyuuma et al. ont découvert que l'interaction entre AMSH et CHMP3 est nécessaire à l'activité de l'enzyme *in vivo* (Kyuuma et al., 2006). Il semble que cette interaction soit aussi supportée par le domaine MIM de la protéine du complexe ESCRT-III et le domaine MIT prédit chez AMSH (Tsang et al., 2006). De plus amples informations concernant ces interactions permettraient de mieux comprendre le recrutement des acteurs de la scission membranaire et de leurs régulateurs lors des processus cellulaires impliquant la machinerie ESCRT.

I.1 Interactions entre AMSH et les protéines CHMP

La structure d'AMSH 146 en complexe avec la partie C-terminale de CHMP3 a précédemment été résolue au sein de notre équipe. Celle-ci, ainsi que des études par ITC (isothermal titration calorimetry), montrent que cette interaction a une affinité de l'ordre du nanomolaire et qu'elle repose sur des ponts salins et des liaisons hydrogènes formés entre les résidus E72, K88, E104 et K107 d'AMSH et respectivement R221, E203, R216 et L220/T219/S222 de CHMP3 (figure 31). Pour confirmer l'importance de ces résidus, nous avons cloné des mutants d'AMSH 146 et vérifié s'ils interagissaient toujours avec CHMP3.

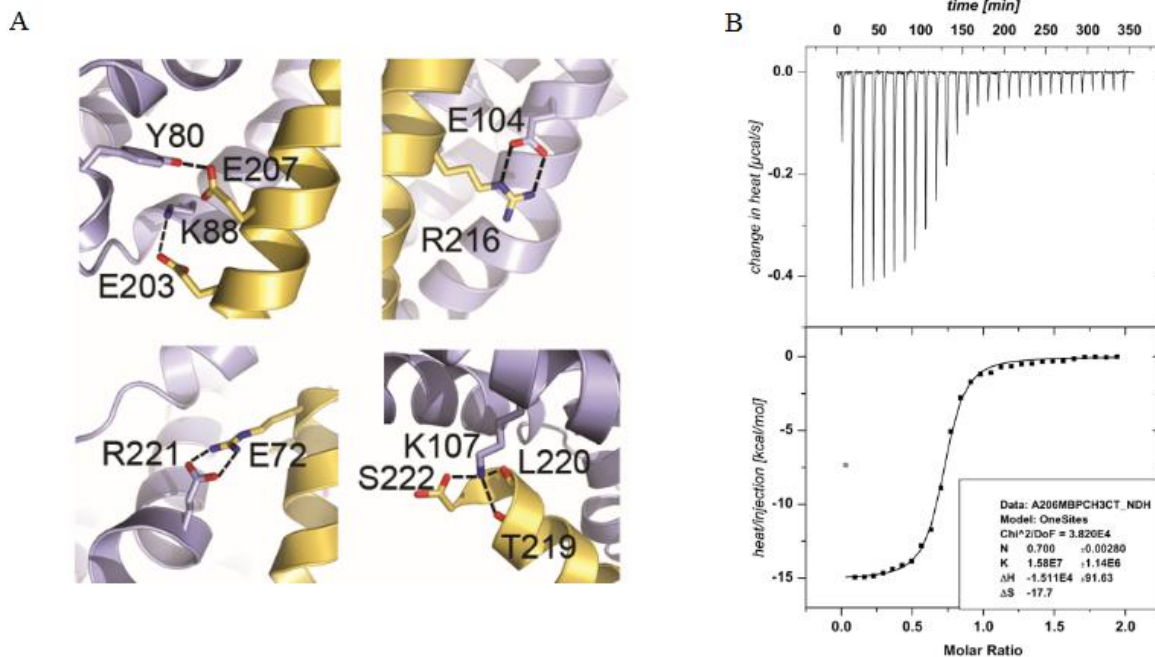


Figure 31 : Etude de l'interaction entre AMSH N-ter et CHMP3 C-ter. A) Zoom sur les résidus impliqués dans cette interaction. B) Détermination de la constante d'affinité par ITC. (Solomons et al., 2011)

I.1.1 AMSH 146 sauvage ou 146 muté et CHMP3

I.1.1.1 Purifications

AMSH 146 sauvage ou muté:

Afin de déterminer quels résidus contribuent le plus à l'interaction avec CHMP3, nous avons muté les acides aminés E72, K88, E104 ou K107 d'AMSH en alanine (un résidu muté par clone). Ensuite, une première tentative de purification a été réalisée avec une induction initiée lorsque la D.O₆₀₀ était de 1 et poursuivie à 18°C, toute une nuit. Le tampon de lyse était composé de 50 mM Tris pH 8,5, 100 mM NaCl et 400 mM d'arginine et les étapes de purification étaient une colonne de résine de nickel puis une filtration sur gel S200. Cet essai a été infructueux et toutes les protéines ont précipité excepté AMSH 146 E104A qui avait été induite plus tôt et moins longtemps. Nous avons donc adapté le protocole afin d'induire la production de protéine quand les cultures atteignent un D.O₆₀₀ de 0,4 et cette induction est poursuivie pendant 5H à 18°C. Nous avons aussi remarqué que 200 mM d'arginine ajoutés au tampon de lyse sont suffisants. L'établissement de ce protocole a permis d'obtenir des profils d'élutions comme illustrés dans la figure 32. Malgré toutes les améliorations apportées, la protéine mutée AMSH146 E72A est restée insoluble.

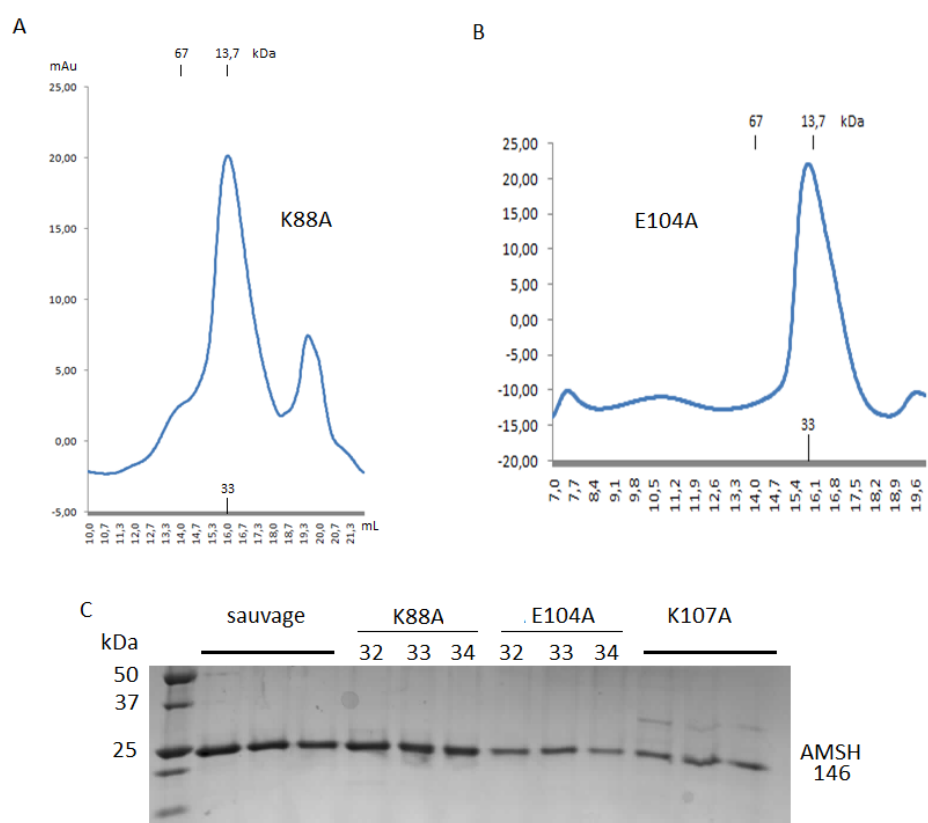


Figure 32 : Dernière étape de purification d'AMSH 146 K88A et E104A. A) Profil d'élution de filtration sur gel d'AMSH 146 K88A. B) Profil d'élution de filtration sur gel d'AMSH 146 E104A. C) Gel SDS-PAGE d'AMSH 146 sauvage, K88A, E104A et K107A purifiés. Les l'élution de protéines standard est repérée par un trait en haut de chaque profil.

I.1.1.2. Co-précipitation

Pour étudier les interactions entre AMSH 146 muté ou non et CHMP3 Fl nous avons réalisé une expérience de co-précipitation.



Figure 33 : Test d'interaction entre AMSH 146 et CHMP3 Fl. Gauche : quantité de protéine utilisée pour chaque test. Droite : co-précipitation de CHMP3 par His-AMSH 146 sauvage ou muté

La figure 33 montre que pour une même quantité d'AMSH sauvage ou muté utilisée, la protéine CHMP3 Fl n'est pas fixée de la même façon. En effet, alors qu'AMSH sauvage co-précipite CHMP3 Fl à un rapport d'environ 1:1, la bande de co-précipitation de CHMP3 par AMSH146 K88A est très faible et celles d'AMSH146 E104 et K107 ne sont presque pas visibles. Ces mutations déstabilisent donc l'interaction avec CHMP3. Ceci confirme l'hypothèse que les résidus K88, E104 et K107 sont importants pour la liaison CHMP3/AMSH et que cette liaison est différente des interfaces précédemment observées entre les domaines MIT de VPS4 ou la spastine et MIM de CHMP1A, CHMP6 ou CHMP1B.

I.1.2 AMSH Fl et CHMP3 Fl : Co-purification et co-cristallisation

D'après les résultats précédents, ainsi que ceux obtenus par Julianna Solomons, AMSH et CHMP3 interagissent de façon spécifique et avec une forte affinité. Cette interaction est décrite à l'échelle atomique par la structure cristallographique d'AMSH 146 et CHMP3 C-ter mais il serait intéressant d'étudier comment les protéines entières se comportent au sein de ce complexe. C'est pourquoi nous avons essayé de cristalliser AMSH Fl en complexe avec CHMP3 Fl. Pour cela, nous avons dans un premier temps co-purifié ces deux protéines. AMSH Fl et CHMP3 Fl sont préalablement purifiées séparément puis le complexe est formé avant la dernière étape de filtration sur gel. La purification d'AMSH Fl seule est décrite dans la partie III.1.2. Celle de CHMP3 Fl comporte quatre étapes : une première colonne de résine de nickel puis le clivage de l'étiquette par la protéase TEV couplé à une dialyse d'une nuit. Ensuite, une seconde colonne de résine de nickel est utilisée pour retenir l'étiquette puis une filtration sur gel sur colonne S75 est réalisée et les résultats sont présentés dans la figure 34.

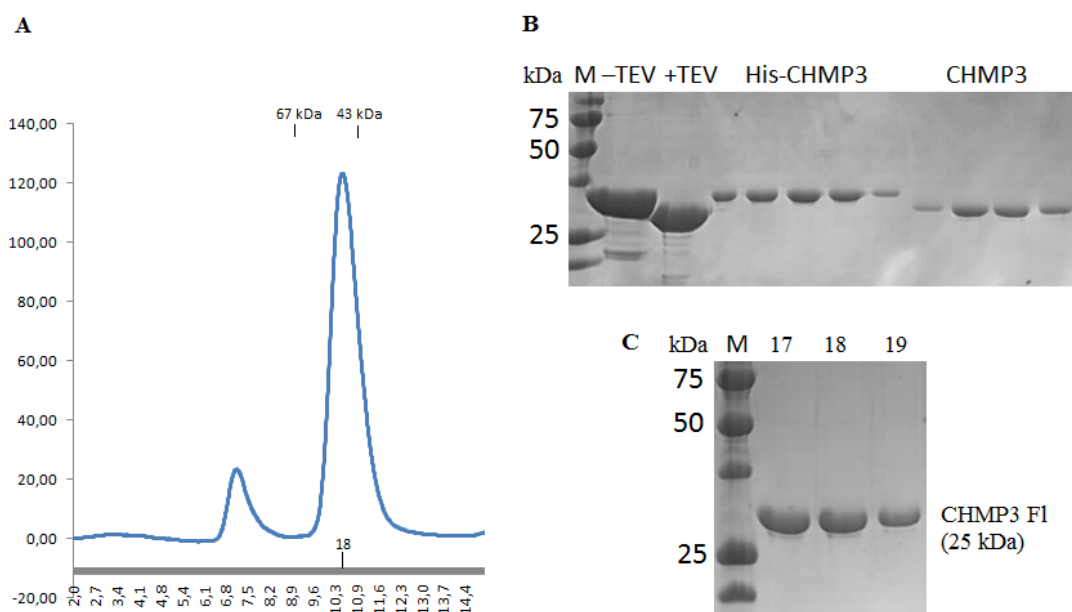


Figure 34 : Purification de CHMP3 Fl. A) Profil d'élution de filtration sur gel sur colonne S75. B) Clivage à la protéase TEV de l'étiquette hexa-histidine. C) Gel SDS-PAGE correspondant à l'élution de la filtration sur gel. L'élution de protéines standards est repérée par un trait en haut du profil A.

Comme la protéine CHMP3 forme des agrégats à haute concentration, il est important de ne pas trop la concentrer avant de la charger sur la colonne de filtration sur gel, quitte à répéter cette expérience plusieurs fois pour avoir suffisamment de protéine. Le pic d'élution majeur, à environ 10,5mL correspond à CHMP3 Fl. Ce volume d'élution est plus petit que celui attendu pour un monomère et correspondrait à un dimère de CHMP3 Fl. Cet état oligomérique semble être confirmé par des analyses de SAXS mais n'empêche pas la formation du complexe AMSH/ CHMP3 Fl. Il se peut donc que, selon les conditions de purification, CHMP3 Fl soit dimérique et que cette interaction soit déplacée par la forte affinité d'AMSH pour CHMP3. Après toutes ces étapes, CHMP3 Fl est incubée avec AMSH Fl au rapport molaire de 3:1. Puis le complexe concentré est séparé de l'excès de CHMP3 par filtration sur gel.

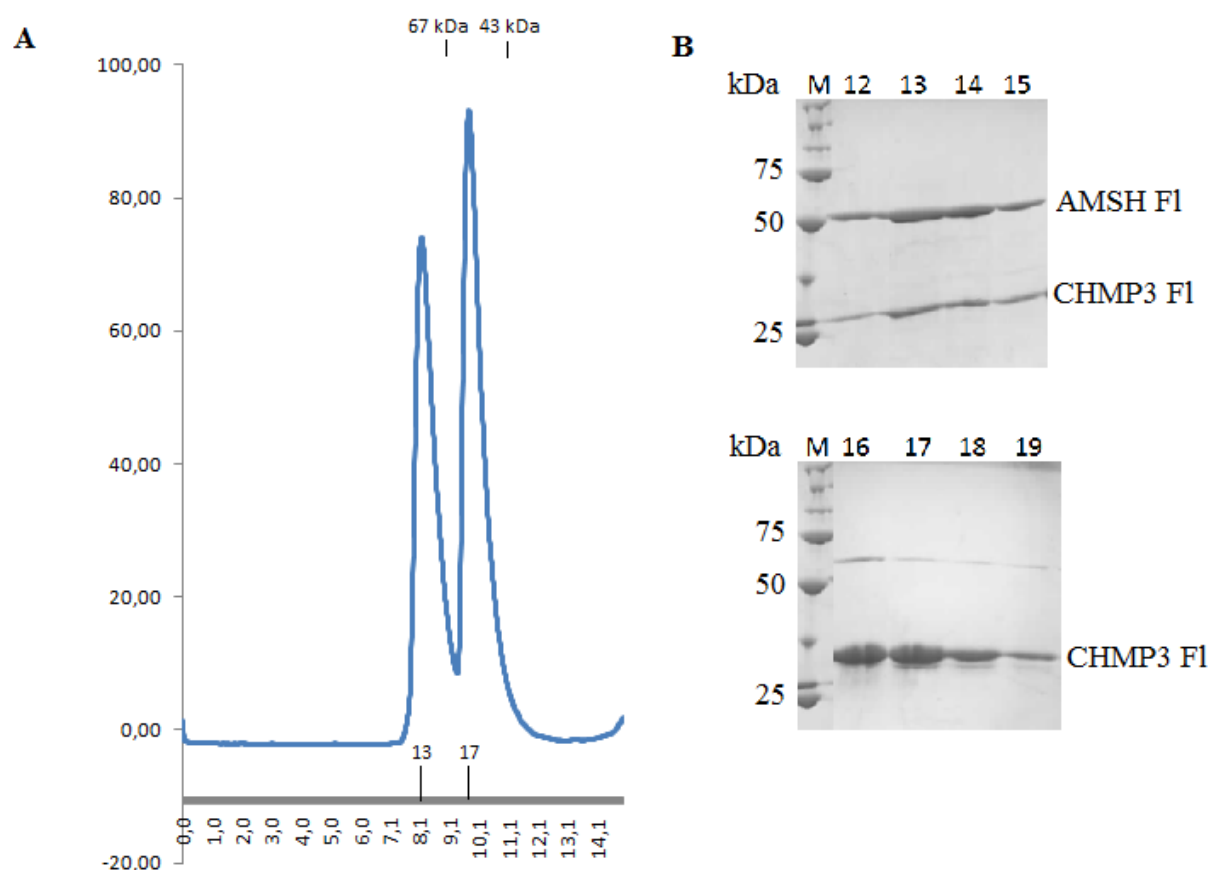


Figure 35 : Purification de CHMP3 Fl et AMSH Fl. A) Profil d'élution de filtration sur gel sur colonne S75. B) Gels SDS-PAGE correspondants aux fractions d'élution de la colonne S75.

La figure 35 confirme la forte interaction entre CHMP3 Fl et AMSH Fl. En effet le complexe résiste à la filtration sur gel et les protéines, malgré une taille différente, co-éluent dans les fractions 12 à 15 à un volume de 8,5mL. Ce volume est proche du volume mort de la colonne mais aucune épaule d'agrégats n'est observée et des essais de purification sur colonne S200 n'ont pas permis de séparer le complexe et l'excès de CHMP3 Fl. Les fractions 13 et 14 sont ensuite concentrées jusqu'à $1,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ puis envoyées au robot de cristallisation à haut débit de l'EMBL afin de tester de nombreuses conditions. Cet essai n'a pas abouti à une cristallisation ou micro-cristallisation. L'échantillon n'est peut-être pas assez concentré et il

serait intéressant de recommencer cette expérience avec une gamme de concentrations plus élevées.

I.1.3 Etude de l'interaction entre AMSH et CHMP1A ou CHMP1B

L'interaction d'AMSH avec les protéines CHMP1A et CHMP1B a été identifiée par Agromayor et Martin-Serrano en 2006. Ces dernières forment aussi un complexe avec d'autres protéines contenant un domaine MIT comme VPS4, UBPY ou la spastine (Stuchell-Brereton et al., 2007) (Row et al., 2007) (Yang et al., 2008). Afin de déterminer si AMSH interagit avec les protéines CHMP1 de la même façon qu'avec CHMP3 nous avons réalisé des mesures d'interaction par SPR et des essais de co-précipitation

I.1.3.1 Purifications

MBP-AMSH 206 :

Les expériences de SPR entre AMSH et CHMP1A ou 1B nécessitaient la purification de plus de matériel biologique que pour les tests de co-précipitation, or AMSH N-ter 146 était trop peu soluble. Nous avons donc choisi de travailler avec une construction plus longue d'AMSH N-ter : AMSH 206, comportant une étiquette MBP à son extrémité N-terminale. Le protocole de purification de MBP-AMSH 206 a été modifié plusieurs fois afin d'être amélioré. Initialement, il était composé d'une colonne d'amylose suivie d'une colonne échangeuse d'anion (HiTrap Q) puis d'une filtration sur gel sur colonne S200. Le premier milieu de culture utilisé était du milieu LB miller mais nous nous sommes aperçu que notre protéine était mieux exprimée et plus soluble lorsque la culture était réalisée dans un milieu plus riche, le TB (terrific broth). Aussi, le tampon de lyse initial, ainsi que tous les autres tampons de purification contenaient de l'HEPES pH 8,0 idéal pour mesurer les résonnances plasmoniques de surface (SPR). Dans un premier temps, comme pour AMSH 146, nous avons essayé d'améliorer la solubilité de la protéine en ajoutant de l'arginine et du glutamate dans ces tampons mais ces additifs n'ont pas apporté d'évolution. Ensuite, AMSH 146 étant plus soluble dans du tampon Tris, nous avons effectué les deux premières étapes de purification de MBP-AMSH 206 dans ce tampon ce qui nous a permis d'augmenter la solubilité de notre protéine. Alors, MBP-AMSH 206 élue de la colonne échangeuse d'anion dès 230mM de NaCl puis les agrégats toujours présents dans l'échantillon sont séparés lors de la dernière étape de filtration sur gel. Celle-ci permet aussi d'obtenir MBP-AMSH 206 dans du tampon 50 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl et 3,4 mM EDTA (tampon de SPR). Elle peut être répétée plusieurs fois et la protéine ainsi purifiée sera concentrée jusqu'à 15 μ M. (figure 36)

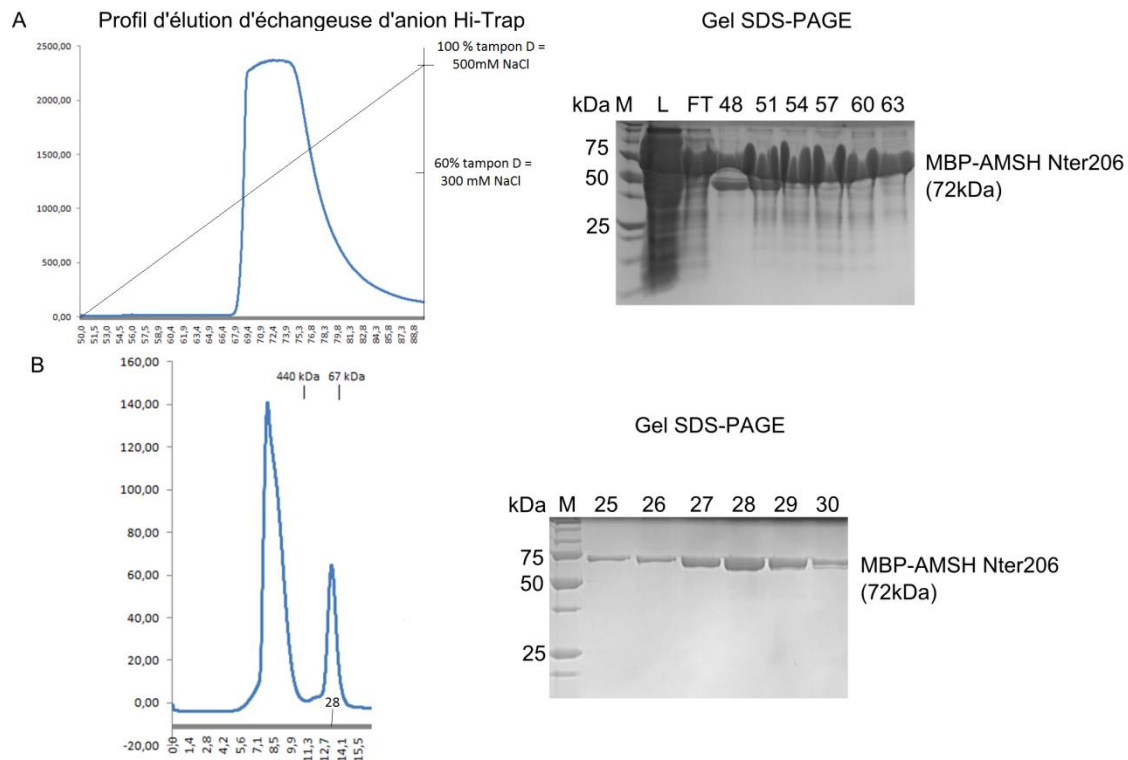


Figure 36 : Profils d'élution de MBP-AMSH 206 sur colonnes échangeuse d'anion et de filtration sur gel. A) Elution et gel SDS-PAGE de colonne échangeuse d'anion HiTrap Q. B) Elution et gel SDS-PAGE de filtration sur gel S200.

CHMP1A C-ter, 1B C-ter:

Les protéines CHMP1A C-ter, CHMP1B C-ter ont-elles aussi été purifiées afin de réaliser des tests d'interaction avec AMSH 206. Elles ont été clonées dans le vecteur d'expression bactérienne pGEX4T3 et possèdent donc une étiquette GST (glutathion S-transferase). Cette étiquette est conservée et sera utilisée pour accrocher le ligand CHMP à une puce CM5. La première étape de purification est une colonne de glutathion sépharose suivie directement d'une filtration sur gel S200. Le profil d'élution (figure 37A et B) n'est pas parfaitement symétrique et les protéines éluent à un volume correspondant à une forme dimérique en solution. Cela peut être dû à une dimérisation de l'étiquette GST. Des produits de dégradation sont aussi visibles sur le gel SDS-PAGE (figure 37A et B) mais ils sont très minoritaires par rapport à la protéine d'intérêt.

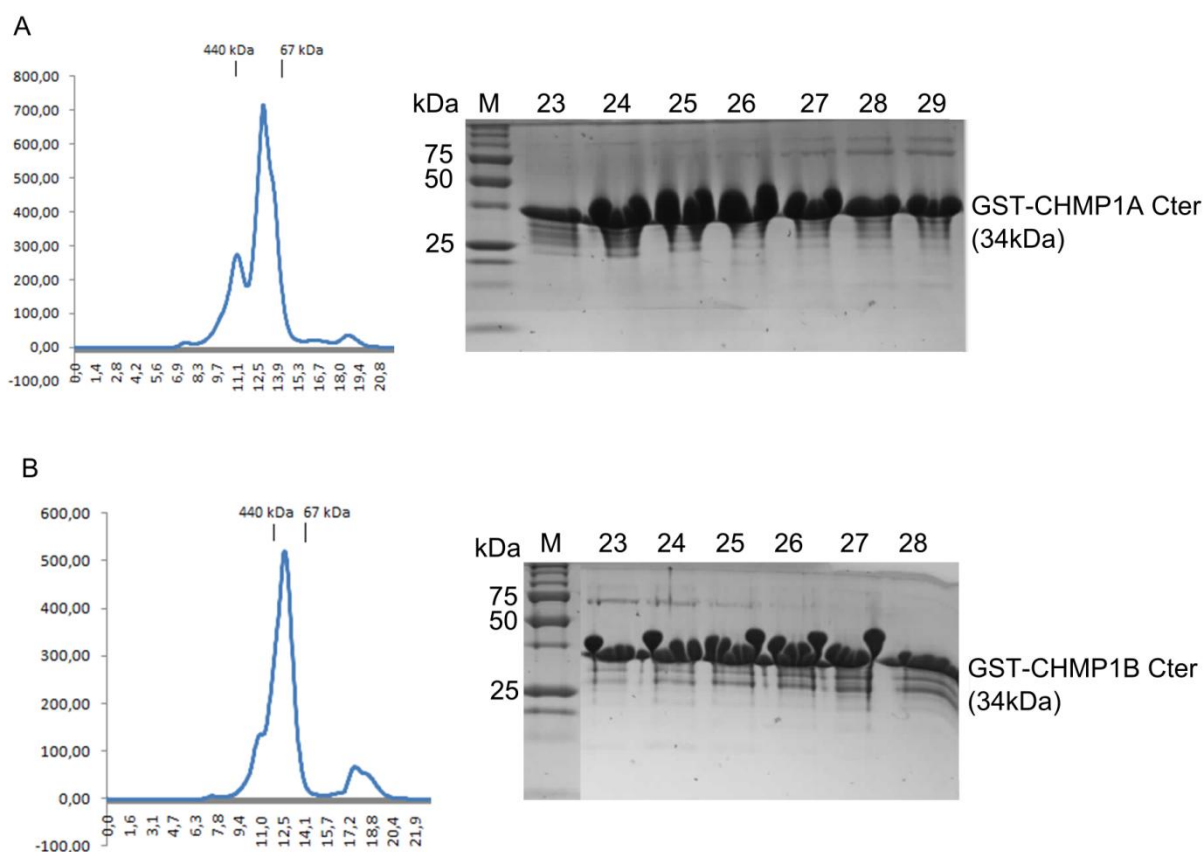


Figure 37 : Dernière étape de purification des protéines GST-CHMP1A C-ter et GST-CHMP1B C-ter. A) Profil d'élution d'une colonne S200 et gel SDS-PAGE de GST-CHMP1A C-ter. B) Profil d'élution d'une colonne S200 et gel SDS-PAGE de GST-CHMP1B C-ter.

I.1.3.2 Mesure des résonances plasmoniques de surface entre MBP-AMSH Nter206 et GST-CHMP1A C-ter ou GST-CHMP1B C-ter (SPR)

Afin d'étudier s'il existe différentes interactions entre AMSH et les protéines CHMP, nous avons mis en place des mesures de résonances plasmoniques de surface entre CHMP1A ou CHMP1B et AMSH 206 (figures 38 et 39). A chaque changement à la surface de la puce, le signal est enregistré et retranscrit sur un sensogramme en RU (response unit ou resonance unit), c'est une unité arbitraire telle que 1 RU correspond à un changement d'angle de $0,0001^\circ$. Lors de ces mesures CHMP1A ou 1B sont les ligands, attachés à la puce CM5 via des anticorps anti-GST et AMSH 206 est l'analyte, écoulé sur la surface.

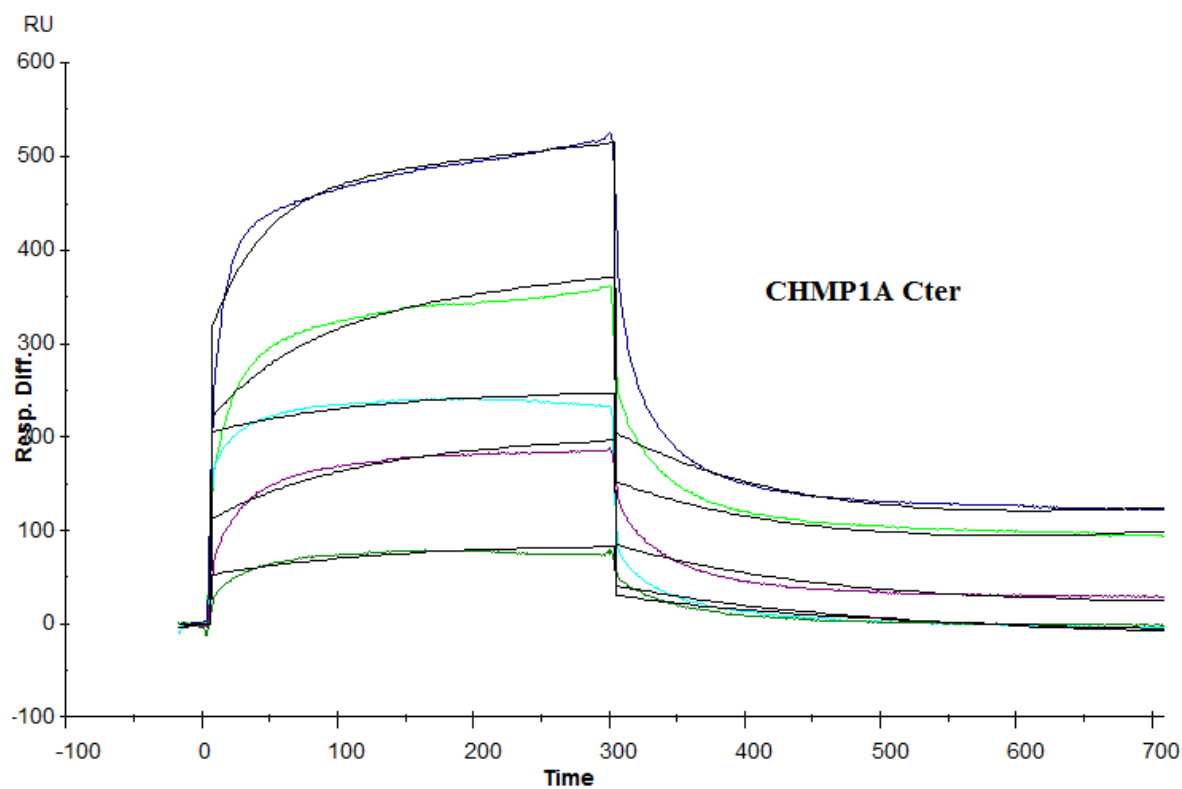


Figure 38 : Analyse des résonances plasmoniques de surface du complexe AMSH N-ter 206/CHMP1A C-ter.

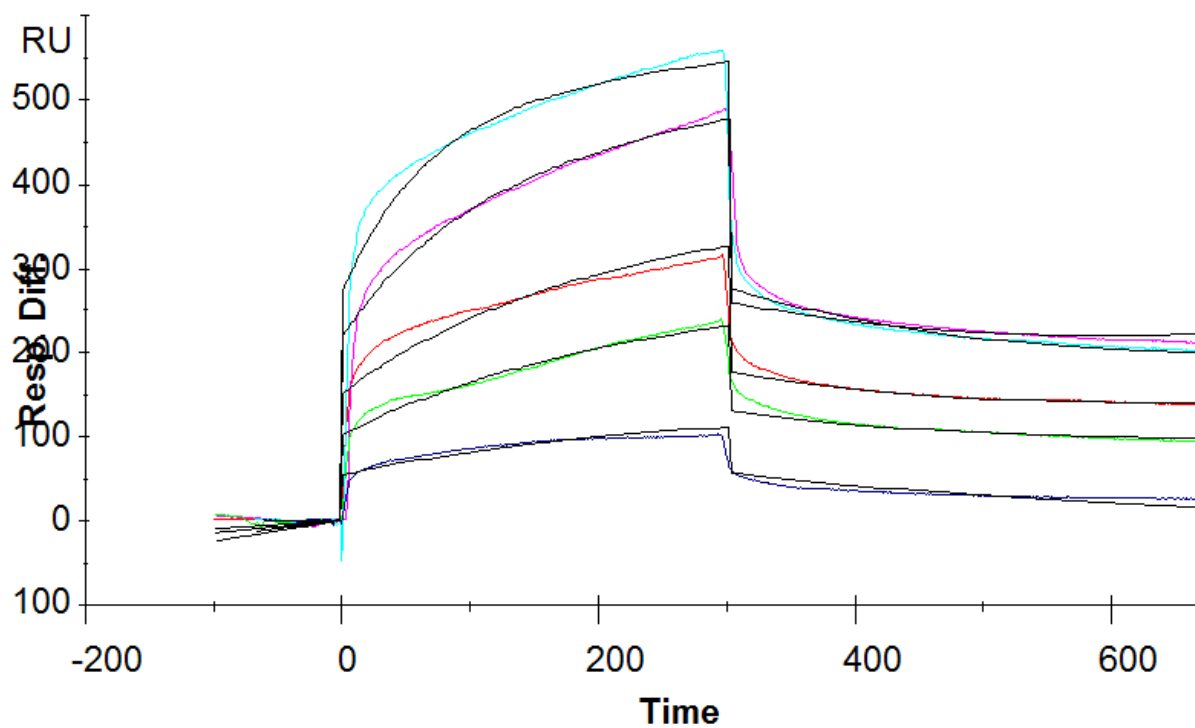


Figure 39 : Analyse des résonances plasmoniques de surface du complexe AMSH N-ter 206/CHMP1B C-ter.

Les figures 38 et 39 montrent les résultats d'interaction mesurée par SPR obtenus pour AMSH 206 avec, respectivement, CHMP1A C-ter et CHMP1B C-ter. Grâce à la superposition du modèle théorique 1 :1 langmuir aux résultats expérimentaux et grâce aux calculs du logiciel BIAevaluation (Biacore), nous obtenons des constantes d'affinités (K_D) de 1,49 μ M pour CHMP1A et 1,16 μ M pour CHMP1B. Ces deux valeurs sont très proches et environ 20 fois plus élevées que celle mesurée pour l'interaction CHMP3 et AMSH 206. Ce qui signifie que CHMP3 a une affinité 20 fois plus forte pour AMSH 206 que CHMP1A ou CHMP1B. Cette préférence d'AMSH pour CHMP3 peut être due à différents modes d'interaction. Alors, la mutation des résidus K88, E104 et K107, que nous avons identifiés précédemment comme étant des résidus clefs dans l'interaction CHMP3/AMSH, ne changerait pas la capacité d'AMSH à co-précipiter CHMP1A ou CHMP1B. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons donc mis en place des essais de co-précipitation de CHMP1B par AMSH sauvage ou muté.

1.1.3.3 Co-précipitation

Ces essais de co-précipitation ont été effectués plusieurs fois afin de déterminer les meilleures conditions d'interaction sans qu'il y ait d'interactions non spécifiques. Après optimisation, le tampon final contient : 50 mM Tris pH 8.5, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.25% CHAPS. Le CHAPS est essentiel pour limiter les interactions non spécifiques entre GST-CHMP1B et la résine de nickel.



Figure 40 : Test d'interaction entre AMSH 146 et CHMP1B C-ter. Gauche : quantité de protéine utilisée pour chaque test. Droite : co-précipitation de CHMP1B par His-AMSH 146 sauvage ou muté

Nous pouvons remarquer dans la figure 40 que l'intensité de la bande de co-précipitation de CHMP1B par AMSH 146 sauvage est similaire à celle des bandes de co-précipitation par AMSH muté K88A ou E104A. La mutation de ces résidus n'a donc pas d'effet sur la liaison entre AMSH et CHMP1B. Ce résultat est différent de celui observé pour CHMP3 et confirme que les résidus impliqués dans l'interaction entre AMSH et CHMP3 ne sont pas les mêmes que ceux impliqués dans l'interaction de notre enzyme avec CHMP1B.

Les résultats de co-précipitation d'AMSH sauvage ou muté et CHMP3/CHMP1B et de mesure d'interaction par SPR confirment que malgré leur structure similaire en hélice- α CHMP3 C-ter et CHMP1A/1B C-ter doivent interagir avec AMSH de manière différente. Ces données ont permis de compléter celles obtenues auparavant au sein de l'équipe et d'aboutir à la publication d'un article scientifique dans le journal *Structure* intitulé : «Structural basis for ESCRT-III CHMP3 recruitment of AMSH » (annexe).

I.2. Interactions entre UBPY et les protéines CHMP

Malgré une faible conservation de séquence, les structures des parties N-terminales d'AMSH et UBPY sont très proches (figure 41). En effet, ces deux structures forment un domaine MIT qui est capable d'interagir avec le domaine MIM des protéines du complexes ESCRT-III (Avvakumov et al., 2006) (Solomons et al., 2011) (Row et al., 2007) (Agromayor and Martin-Serrano, 2006). Notamment, AMSH et UBPY peuvent toutes deux interagir avec CHMP1B.

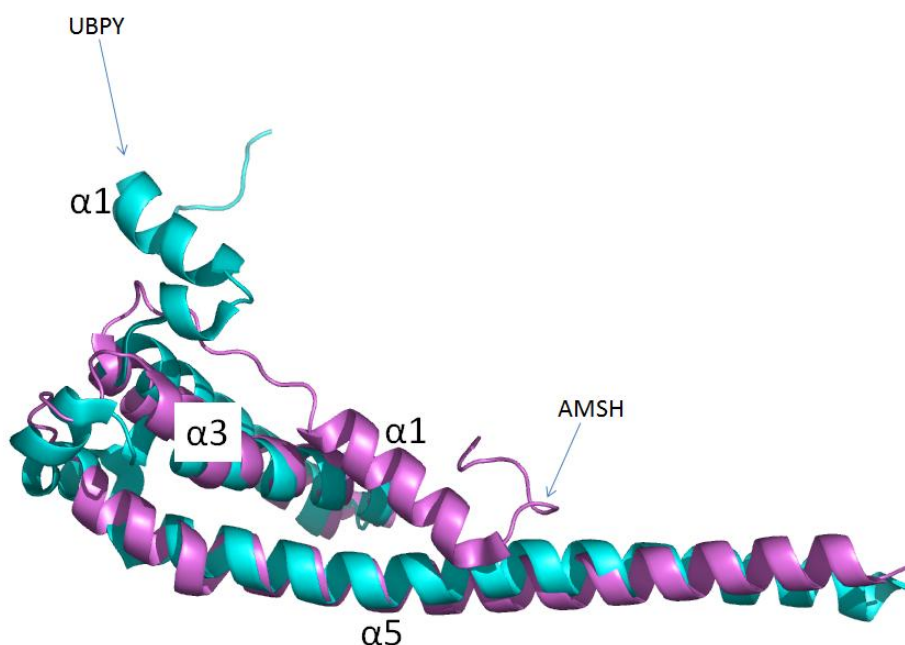


Figure 41 : Superposition structurale des parties N-terminales d'AMSH et UBPY. Violet : AMSH, Bleu : UBPY. (Codes PDB : AMSH : 2XZE, UBPY : 2A9U)

De plus, des résultats obtenus par notre collaboratrice Anne-Claire Jacomin, dans l'équipe du Dr. Marie-Odile Fauvarque ont montré qu'*in vivo* CHMP1B est relocalisée du noyau vers le cytoplasme lorsqu'UBPY est surexprimée et qu'il y a co-précipitation entre CHMP1B (entière ou C-ter) et la partie N-terminale d'UBPY 1-133 (Anne-Claire Jacomin) (figure 42).

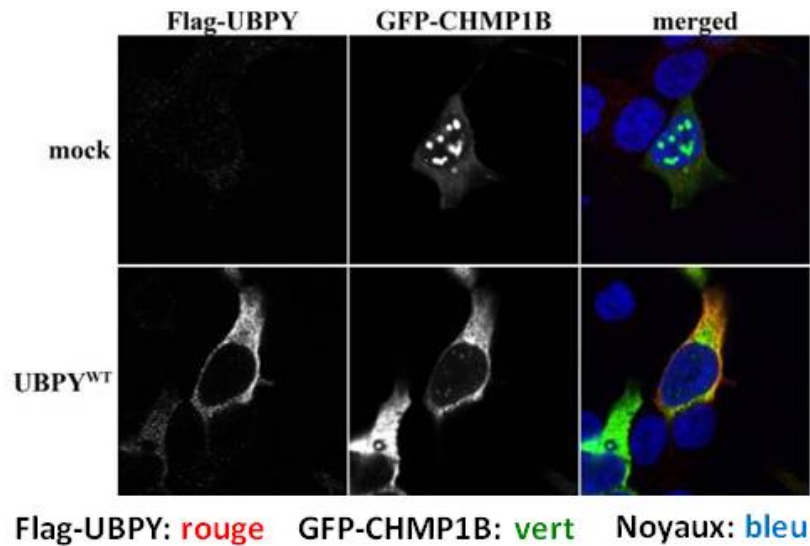
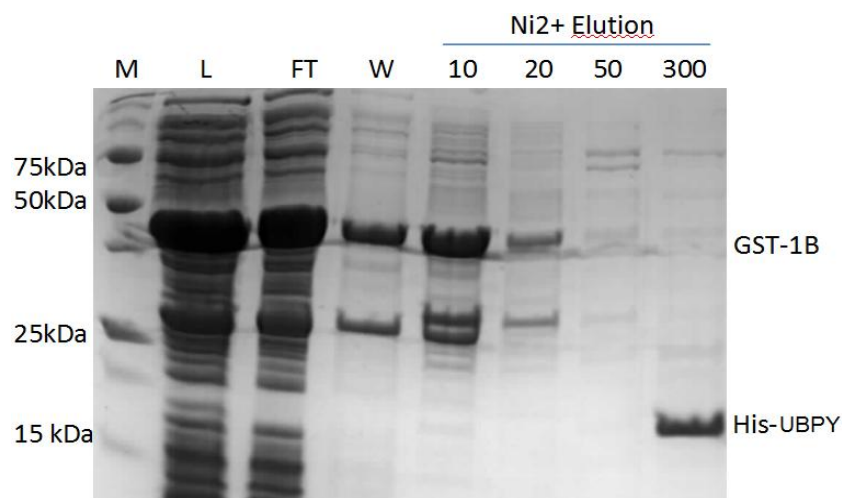


Figure 42 : Relocalisation de CHMP1B due à la surexpression d'UBPY. (Anne-Claire Jacomin)

La cristallisation de ce complexe permettrait d'obtenir plus d'informations sur les interactions qu'il existe entre UBPY et CHMP1B et d'enrichir les connaissances sur les interfaces formées par les domaines MIM et MIT et le recrutement des ubiquitines-hydrolases au sein des processus cellulaires impliquant la machinerie ESCRT.

1.2.1 Essais de co-purification

Dans un premier temps, nous voulions confirmer l'existence de l'interaction *in vitro* entre nos constructions d'UBPY N-ter (8-138) et CHMP1B C-ter (126-199), nous avons donc essayé de co-purifier ces deux protéines. Pour le premier essai, les étiquettes GST pour CHMP1B et hexa-histidine pour UBPY sont conservées et la co-purification se fait sur une colonne de



résine de nickel (figure 43).

Figure 43 : Co-purification de CHMP1B C-ter et UBPY N-ter sur colonne de résine de nickel. M : marqueur, L : (load) charge, FT: (Flow through) non retenu, W : (wash) lavage

Comme nous pouvons le remarquer dans la figure 43, la protéine GST-CHMP1B C-ter se retrouve dans la fraction qui n'est pas retenue par la colonne ou dans les deux premiers lavages alors que la protéine hexa-histidine-UBPY N-ter est très bien accrochée sur la résine et est éluée avec 300 mM d'imidazole. Cette expérience ne confirme pas l'interaction entre notre construction d'UBPY 8-138 et la partie C-terminale de CHMP1B. Nous avons donc utilisé d'autres tests permettant de mettre en évidence une interaction inter-protéique comme la co-purification sur colonne de filtration sur gel, la co-précipitation *in vitro* ou la mesure des résonances plasmoniques de surface (SPR).

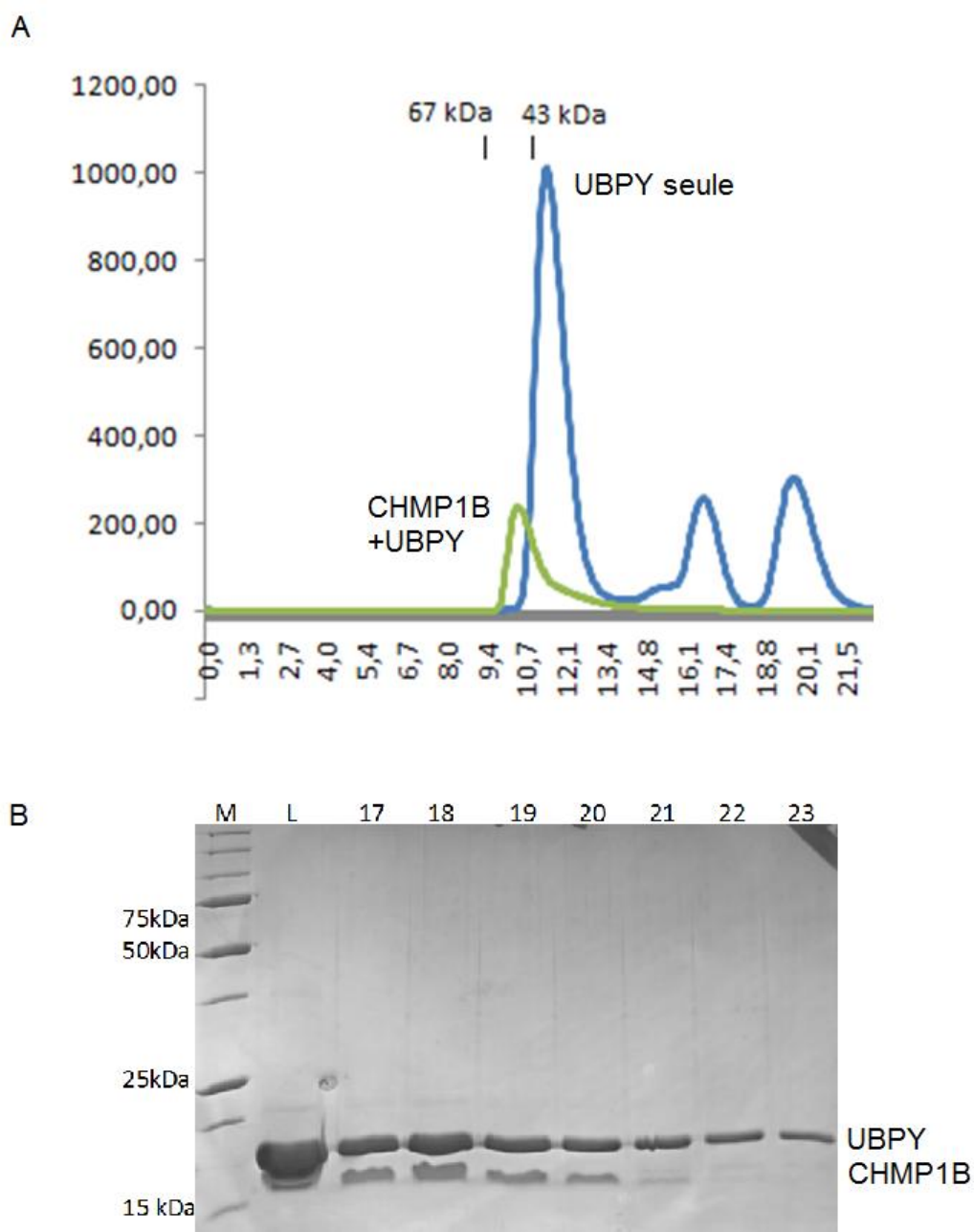


Figure 44 : Co-purification sur colonne de filtration sur gel d'UBPY N-ter et CHMP1B C-ter. A) Profil d'élution d'UBPY seule (courbe bleue) ou UBPY avec CHMP1B (courbe verte). B) Gel SDS-PAGE de la co-élution de CHMP1B et UBPY

CHMP1B C-ter n'ayant pas d'acides aminés aromatiques permettant de mesurer l'absorption à 280 nm, le seul signal visible sur le profil d'élution de la colonne de filtration sur gel est celui d'UBPY. La figure 44 montre que lorsqu'UBPY est en présence de CHMP1B elle est éluée plus tôt de la colonne de filtration sur gel. Ce décalage, remarqué sur une même colonne, lors de deux purifications successives, est de 1 mL et pourrait provenir soit d'une interaction entre ces deux protéines soit du fait que nous avons injecté une quantité différente d'UBPY lors de la purification du complexe afin d'obtenir un excès de CHMP1B. Nous pouvons aussi observer sur la figure 44A que le volume d'élution d'UBPY est proche d'une protéine globulaire de 43 kDa. Cela signifierait qu'UBPY est dimérique en solution ou très allongée.

1.2.2 Co-précipitation

Les résultats obtenus lors des expériences de co-purification et de filtration sur gel sont contradictoires, c'est pourquoi nous avons continué à effectuer des tests et notamment une co-précipitation sur résine de nickel. Les deux protéines sont d'abord purifiées séparément. L'étiquette hexa-histidine d'UBPY est conservée alors que la GST est coupée et séparée de CHMP1B.

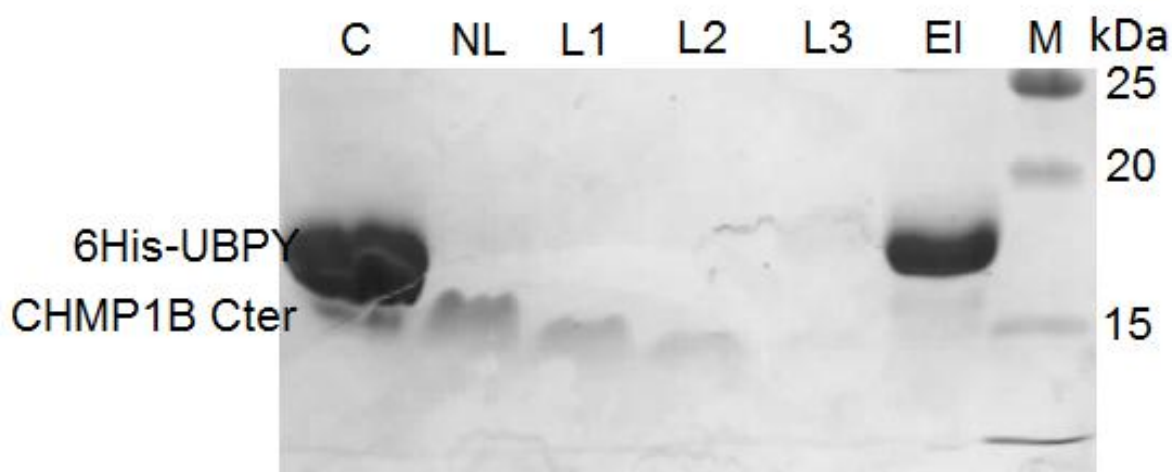


Figure 45 : Co-précipitation de CHMP1B C-ter et UBPY N-ter. C : chargé, NL : non lié, L : lavage, El : élution, M : marqueur

Le gel SDS-PAGE de la co-précipitation d'UBPY et CHMP1B (figure 45), montre que, malgré un très grand excès d'UBPY, CHMP1B n'est pas retenu par cette dernière et élué dans les fractions de lavage. Nous avons démontré précédemment que l'interaction qu'il existe entre AMSH et CHMP1A/1B est une interaction faible, de l'ordre du μM . Il est possible que l'interaction entre UBPY et CHMP1B soit encore plus faible et qu'elle nécessite une technique plus sensible pour définir si oui ou non cette interaction existe. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la technique de SPR.

1.2.3 Résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface est la technique appropriée pour détecter de faibles interactions et avec peu de matériel biologique. Cependant, la détection du signal peut être de plus ou moins bonne qualité selon la mise en place de l'expérience. C'est pourquoi nous avons testé différents montages : soit CHMP1B attachée à la puce via son étiquette GST et des anticorps anti-GST soit UBPY biotinylée et capturée sur la surface de la puce par de la streptavidine. L'autre protéine est alors écoulée dans un flux continu dans les différentes cellules de la puce. La quantité de ligand à fixer sur la puce a été déterminée grâce à la formule :

$$R_{\text{ligand}} = (R_{\text{max}} * M_w \text{ ligand}) / M_w \text{ analyte} \quad (5)$$

avec R_{ligand} , la quantité de ligand à fixer, R_{max} la réponse maximum désirée et M_w , les poids moléculaire du ligand ou de l'analyte. Pour un R_{max} de 100 RU, généralement conseillé en SPR, cette valeur est de 184. Pour le premier essai, nous étions au-delà de cette valeur avec 293 RU de GST-CHMP1B fixée. His-UBPY a ensuite été injectée à une concentration de 2000 nM mais n'a produit aucun signal d'interaction. Nous avons alors essayé d'étudier cette interaction avec His-UBPY comme ligand et GST-CHMP1B comme analyte. Pour cela nous avons biotinylé His-UBPY puis nous l'avons attachée dans une cellule de la puce via l'interaction avec de la streptavidine préalablement liée covalamment sur la surface. La quantité de His-UBPY biotinylée nécessaire pour obtenir théoriquement une réponse de 100 RU était de 54,3 RU. Cette fois encore nous étions au-delà de cette valeur avec 256 RU de His-UBPY biotinylée fixée. Pour cet essai nous avons aussi augmenté significativement la concentration d'analyte avec une injection de GST-CHMP1B à 42 μM . Cette fois encore, nous ne détectons aucun signal et le sensogramme est plat. Il n'y a donc pas d'interaction *in vitro* entre nos constructions de CHMP1B C-ter et UBPY N-ter. Les raisons possibles de ce manque d'interaction seront discutées à la fin de ce manuscrit.

II. Etude de l'interaction entre AMSH et STAM et ses conséquences sur l'activité enzymatique de l'ubiquitine-hydrolase.

AMSH interagit avec STAM2 notamment grâce à son domaine SH3 (Tanaka et al., 1999) (Sierra et al., 2010). Or, il a été montré que STAM possède trois domaines capables de lier l'ubiquitine : VHS, UIM et SH3 et que pour son domaine SH3 cette interaction est en compétition avec l'ubiquitine-hydrolase UBPY (Mayers et al., 2011)(Lange et al., 2011) (Lange et al., 2012a) (Lange et al., 2012b). Nous voulions savoir si les deux premiers domaines étaient aussi impliqués dans l'interaction entre STAM et AMSH et quelles seraient les conséquences d'une délétion d'un ou plusieurs de ces domaines dans l'activation d'AMSH. Pour répondre à cette question nous avons purifié différentes constructions de STAM contenant deux (UIM-SH3) ou trois domaines (VHS-UIM-SH3=VUS) (figure 46) interagissant avec l'ubiquitine. Nous avons ensuite étudié les interactions de ces domaines avec AMSH Fl par résonance plasmonique de surface puis analysé leur capacité à activer AMSH Fl lors d'essais enzymatiques.



Figure 46 : Rappel de la position des différents domaines de STAM liant l'ubiquitine et des constructions utilisées lors de cette étude.

II.1 Interaction entre AMSH Fl et la sous-unité STAM d'ESCRT-0

Afin d'étudier l'interaction entre AMSH et les domaines UIM-SH3 ou VHS-UIM-SH3 de STAM nous avons tout d'abord purifié séparément ces protéines.

II.1.1 Purifications

AMSH Fl est purifiée comme décrit dans la section III.1.2.

STAM2 UIM-SH3 :

Le clone de STAM2 UIM-SH3 nous a été cordialement donné par l'équipe du Dr. Olivier Walker et comporte une étiquette Hexa-histidine/NusA. Nus A est une protéine très soluble qui favorise la purification de notre protéine d'intérêt. Cette étiquette ne sera pas conservée au-delà de la première étape de purification. STAM2 UIM-SH3 est bien exprimée et peut être purifiée en grande quantité.

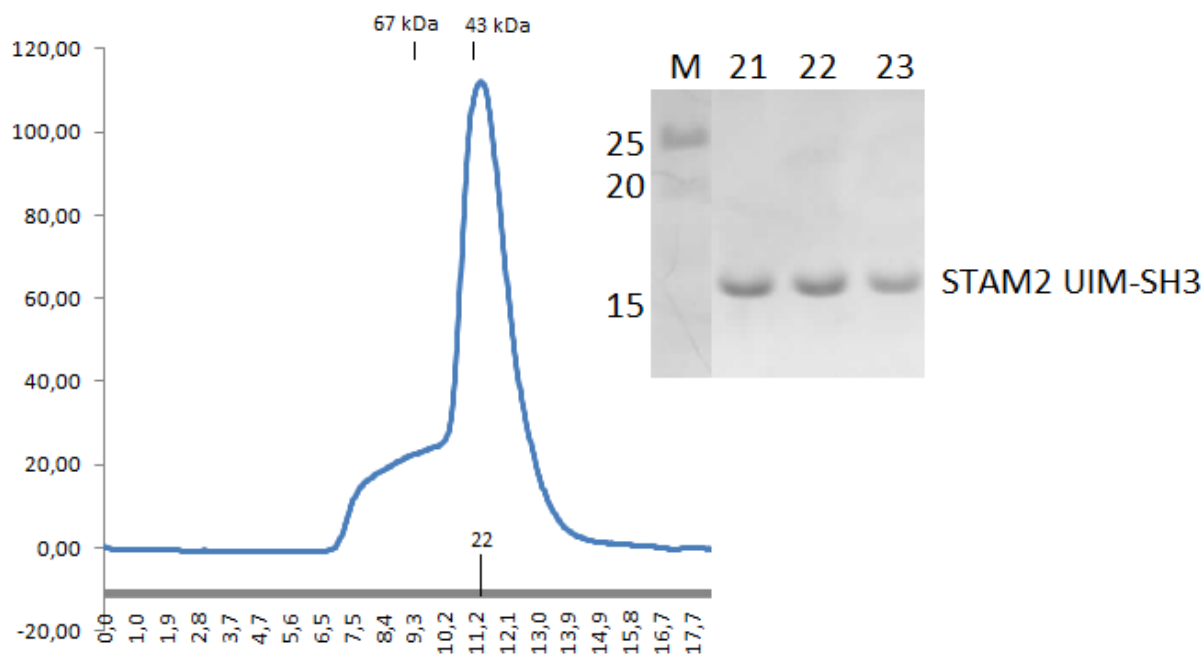


Figure 47 : Profil d'élution et gel SDS-PAGE de l'étape de purification par filtration sur gel de STAM2 UIM-SH3

La figure 47 montre que la protéine élue de la colonne de filtration sur gel S75 à un volume plus petit que ce que nous attendions pour une protéine de cette taille. Ceci pourrait être dû à une conformation allongée de la protéine ou à une forme dimérique présente en solution. Cependant, les analyses par RMN de cette construction par Lange et al., 2012 ont montré qu'elle adopte une structure flexible et allongée en solution et aucune forme dimérique n'a été rapportée.

STAM2 VUS :

STAM2 VUS est initialement exprimée avec une étiquette GST puis cette dernière est clivée et séparée sur colonne de résine de glutathion sépharose. La dernière étape, une colonne de filtration sur gel S75 permet d'obtenir une protéine qui élue à un volume de 10,5 ml ce qui correspondrait ici aussi à une protéine allongée. Nous remarquons lors de cette purification l'élution d'un pic d'aggrégats mais celui-ci est séparé de notre protéine d'intérêt (figure 48).

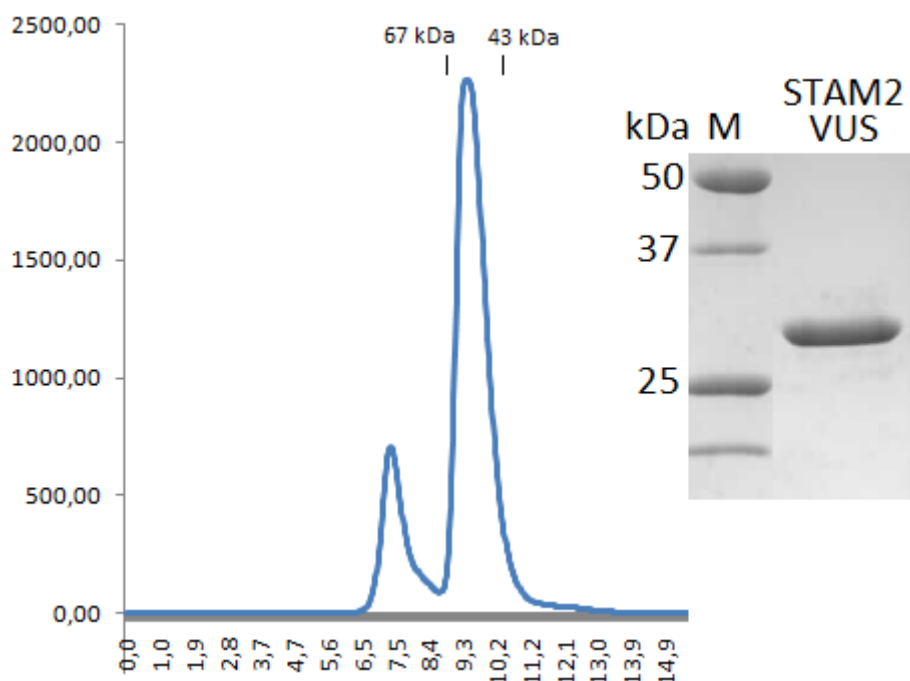


Figure 48 : Profil d'élution et gel SDS-PAGE de la filtration sur gel de STAM2 VUS

Cette protéine est ensuite utilisée comme analyte pour les études de résonance plasmonique de surface.

II.1.2. Résonance plasmonique de surface

Nous avons mesuré l'interaction entre AMSH FI et STAM2 UIM-SH3 ou AMSH FI et STAM2 V.U.S. Actuellement, aucune information n'est connue sur ces liaisons et cette étude nous permettrait de les comparer et d'analyser s'il existe une relation entre force d'interaction et activation de l'activité enzymatique d'AMSH.

AMSH et STAM2 UIM-SH3:

Afin de déterminer l'affinité de STAM2 UIM-SH3 pour AMSH FI, nous avons mis en place des mesures des résonances plasmoniques de surface pour lesquelles AMSH était le ligand et STAM2 UIM-SH3 l'analyte. Après avoir fixé environ 9300 RU d'AMSH FI, STAM2 UIM-SH3 est écoulee à la surface de la puce à des concentrations allant de 1000 à 3000 nM. Aucune régénération n'est nécessaire entre deux mesures car le signal revient à la ligne de base après le délai de 10 minutes, la dissociation est donc totale. Nous avons ensuite analysé ces mesures grâce au logiciel BIAevaluation (Biacore AB) et déterminé les constantes d'association, de dissociation et d'affinité entre nos deux protéines.

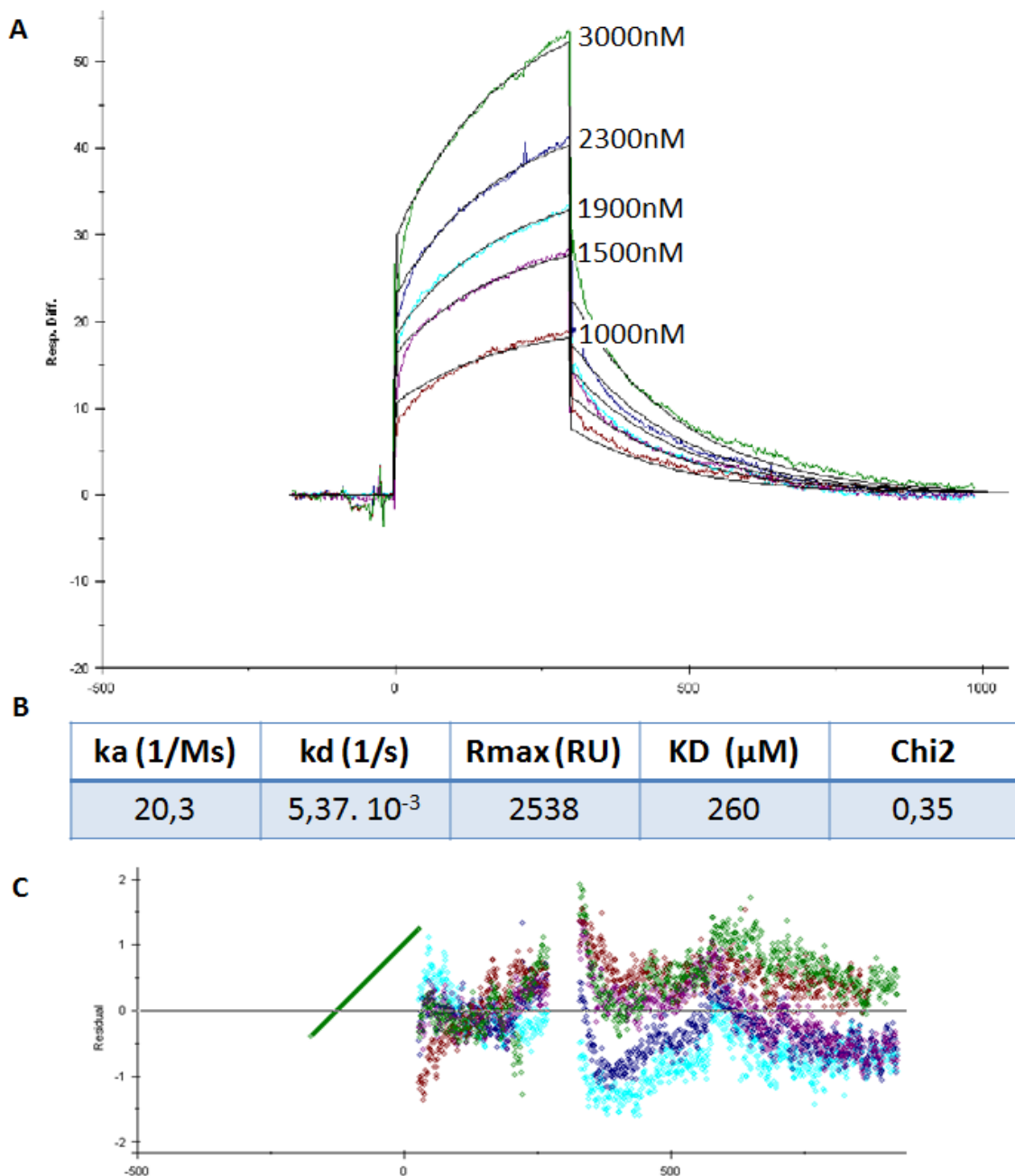


Figure 49 : Mesure d'interaction entre AMSH F1 et STAM UIM-SH3 par résonance plasmonique de surface. A) Superposition du modèle théorique 1 :1 langmuir aux données expérimentales. B) Constantes de cinétique et d'affinité : k_a =constante d'association, k_d =constante de dissociation, Rmax=quantité maximum d'analyte pouvant être lié, KD= constante d'affinité, χ^2 =valeur statistique C) Ecart résiduels entre le modèle et les données expérimentales, une valeur comprise entre -2 et 2 montre que le modèle est en accord avec ces données

Comme nous pouvons le remarquer dans la figure 49, le modèle choisi correspond assez bien aux données, la valeur de χ^2 est inférieure à 5% du Rmax et les résiduels sont compris entre -2 et 2. Les valeurs obtenues sont donc pertinentes. L'affinité de STAM2 UIM-SH3 pour AMSH est de 260 μ M ce qui représente une interaction assez faible. Celle-ci est notamment

bien plus faible que l'interaction d'AMSH avec un autre de ses partenaires : CHMP3 C-ter (63 nM).

AMSH et STAM2 V.U.S. :

Pour analyser si le domaine VHS contribue au renforcement de la liaison entre AMSH et STAM, nous avons mesuré leur interaction par SPR. Lors de ces expériences, environ 2700 RU d'AMSH ont été fixées à la surface de la puce et STAM2 V.U.S. a été écoulee à des concentrations variant de 750 à 9000 nM. La dissociation n'étant pas complète à la fin du délai mis en place après chaque injection, nous avons dû établir une stratégie de régénération de la surface (tableau 4).

Interaction	Acide	Basique	Hydrophobe	Ionique
Forte	pH<2 Glycine/HCl Acide Formique H3PO4	pH>10 NaOH KOH	50% Ethylene glycol	6M Chlorure de guanidine
Intermédiaire	pH<2-2,5 Glycine/HCl Acide Formique H3PO4	pH9-10 Glycine/NaOH NaOH KOH	40% Ethylene glycol	2M MgCl2 4M KCl 3M KSCN
Faible	pH>2,5 Glycine/HCl Acide Formique H3PO4	pH<9 HEPES/NaOH	25% Ethylene glycol	1M NaCl

Tableau 4 : Stratégie usuelle de régénération de surface

Les solutions de régénération sont communément testées en commençant par la moins agressive afin de ne pas détériorer le ligand. Nous avons donc réalisé une première injection avec le tampon utilisé dans l'expérience (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% P20) contenant 1M de NaCl mais celle-ci ne nous a pas permis de retourner au signal de base. Après cela, plusieurs tampons ont été utilisés successivement : NaOH pH9, Glycine pH2,5, Ethylène glycol à différents pourcentages, sans résultats sur la dissociation du complexe. La dernière possibilité était d'injecter du SDS. Comme ce détergent peut aussi détériorer le ligand, nous avons dû réaliser plusieurs cycles d'injection de l'analyte suivi d'une régénération afin de trouver la condition pour laquelle STAM V.U.S. est totalement dissocié et le signal de base n'est pas affecté. Cette condition correspond à une injection d'une solution contenant 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005 % P20 et 0,010 % de SDS. Les résultats ont ensuite été analysés grâce au logiciel BIAevaluation (Biacore AB) et traités de la même façon que précédemment.

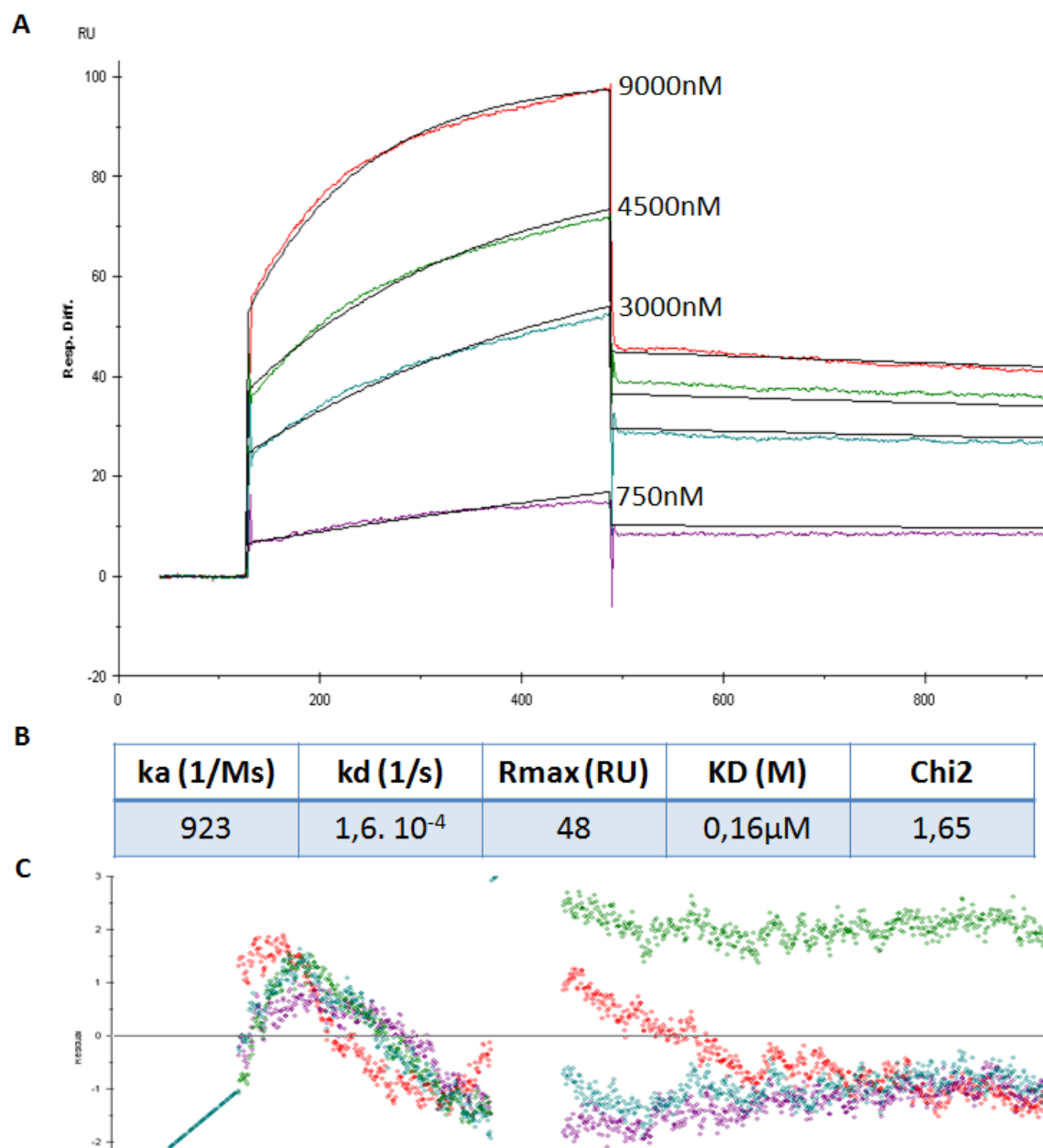


Figure 50 : Mesure d'interaction entre AMSH F1 et STAM V.U.S. par résonance plasmonique de surface. A) Superposition du modèle théorique 1 :1 langmuir aux données expérimentales. B) Constantes de cinétique et d'affinité : k_a =constante d'association, k_d =constante de dissociation, R_{max} =quantité maximum d'analyte pouvant être lié, K_D = constante d'affinité, χ^2 =valeur statistique. C) Ecart résiduels entre le modèle et les données expérimentales, une valeur comprise entre -2 et 2 montre que le modèle est en accord avec ces données

Pour cette expérience le modèle théorique se superpose assez bien aux courbes expérimentales, le χ^2 est inférieur à 5% du R_{max} et les résiduels sont compris entre -2 et 3, nous pouvons donc analyser les constantes cinétiques et d'affinité calculées et les comparer à celles obtenues pour STAM UIM-SH3 (figure 50). Le K_D concernant l'affinité entre AMSH et STAM VUS est de 0,16 μ M. C'est plus de 1600 fois inférieur à celui du complexe précédent. Cependant, cette valeur est surprenante lorsque nous la comparons aux résultats obtenus lors d'une co-purification de STAM VUS et AMSH F1 ou d'une migration sur gel

natif. En effet, sur colonne de filtration sur gel les deux protéines éluent dans deux pics proches mais distants de quelques fractions (figure 51A, pics 1 et 2) et sur gel natif nous ne remarquons aucun décalage de la bande d'AMSH ou de STAM VUS du à la formation du complexe (figure 51). Il semblerait donc que lors de ces expériences le complexe se dissocie, ce qui serait peu probable avec une constante d'affinité de 0,16 μ M. Cette affinité serait donc surestimée et nous discuterons par la suite des raisons qui ont pu nous conduire à cette valeur.

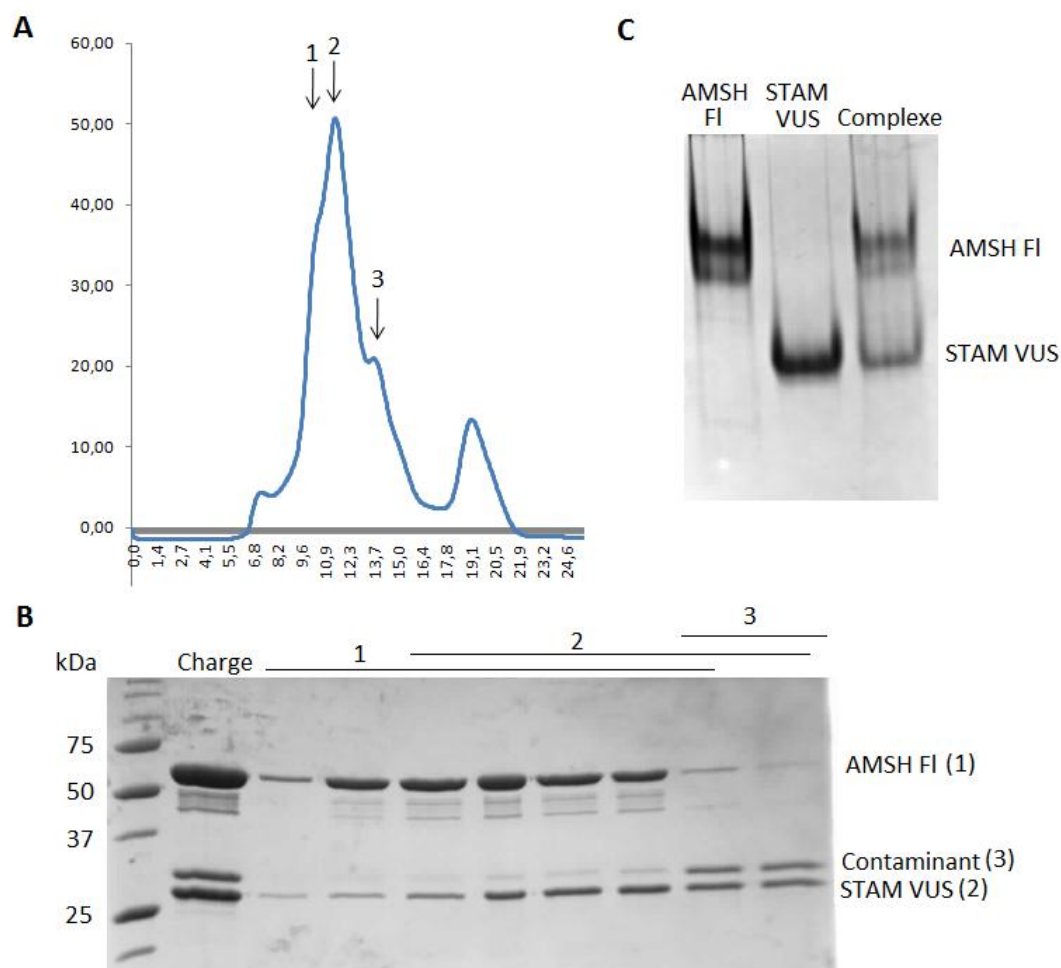


Figure 51 : Co-purification par filtration sur gel d'AMSH FI et STAM VUS. A) profil d'élution de la colonne de filtration sur gel S200. B) Gel SDS-PAGE correspondant à l'élution A. Les trois pics d'élution sont indiqués par des flèches numérotées et ces numéros sont repris dans la partie B. C) Migration sur gel natif d'AMSH et STAM seuls ou en complexe.

II.2 Etude des conséquences des différents domaines de STAM sur l'activation de l'activité enzymatique d'AMSH

L'activité enzymatique d'AMSH est connue pour être spécifique des chaînes d'ubiquitines liées par leur lysines K63 (Kim et al., 2006) (McCullough et al., 2006) et son mécanisme d'action a été précédemment décrit par Davies et al., 2011. Cependant certaines questions

demeurent : quel est le substrat ou quels sont les substrats d'AMSH *in vivo* ? Et comment cette protéase est-elle régulée ? En effet, lorsqu'elle n'est pas recrutée par ses partenaires du système ESCRT, AMSH est majoritairement présente dans le cytoplasme. Aussi, l'engagement de l'ubiquitine dans de nombreuses voies cellulaires implique que les dé-ubiquitinases soient hautement régulées pour ne pas être actives en permanence. AMSH doit être maintenue sous cette forme inactive jusqu'à son recrutement à la membrane (Itoh et al., 2001)(McCullough et al., 2004)(Kyuuma et al., 2006). Afin d'étudier cette régulation de l'activité enzymatique d'AMSH, de confirmer que l'activateur d'AMSH est bien la protéine STAM du complexe ESCRT-0 et de déterminer précisément quel(s) domaine(s) de cette protéine participe(nt) à l'activation de la dé-ubiquitinase, nous avons mis en place différents tests enzymatiques.

II.2 .1 Première approche : observation de la réaction enzymatique à t=30 minutes

Nous voulions tout d'abord contrôler si AMSH C-ter est bien active et si les conditions notre test de dé-ubiquitination sont adéquates. Pour cela, nous avons réalisé un test d'activité enzymatique *in vitro* de notre protéine sur de la di-ubiquitine liée par la lysine K63.

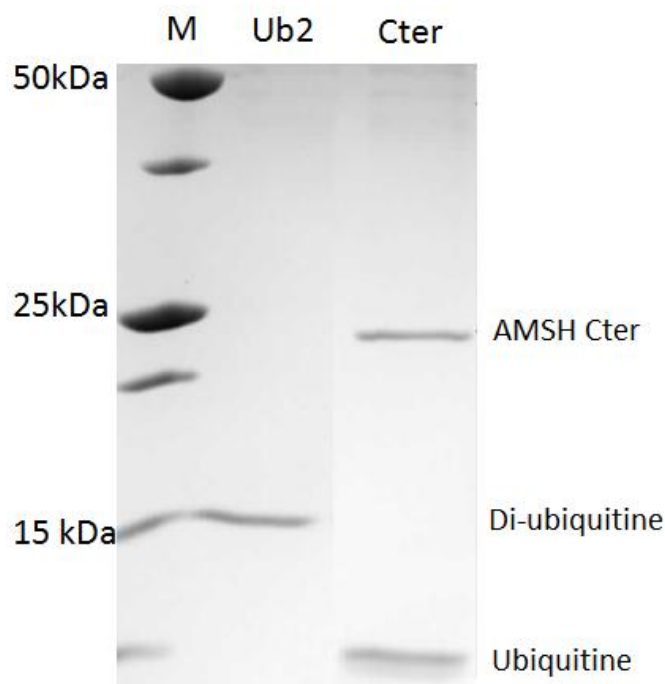


Figure 52 : Test de dé-ubiquitination de la di-ubiquitine liée par la lysine K63 par AMSH C-ter.

La figure 52 montre que la di-ubiquitine liée K63 n'est pas spontanément hydrolysée. Par contre, la partie C-terminale d'AMSH est bien capable de dégrader entièrement la di-ubiquitine en mono-ubiquitine après 30 minutes d'incubation. Cette expérience confirme

donc que notre test fonctionne et nous pouvons maintenant l'appliquer à une cinétique enzymatique et à AMSH FI seule ou en complexe avec STAM.

Les expériences réalisées par d'autres équipes montrent une activité enzymatique d'AMSH FI avec ou sans activateur, après 2H d'incubation avec son substrat ou, au mieux, après 15 minutes (McCullough et al., 2006) (Kim et al., 2006). Les constantes cinétiques qui caractérisent une réaction sont : la constante de Michaelis-Menten qui représente la concentration de substrat nécessaire pour une catalyse efficace, aussi appelée K_m et le nombre de molécules de substrat fixés par un site actif par seconde, aussi appelée K_{cat} . Au sein d'une cellule les réactions enzymatiques peuvent être très rapides (acétylcholinestérase, $K_{cat}/K_m=1,6.10^8 M^{-1} s^{-1}$) comme très lentes (β -secretase 1 (BACE1), $K_{cat}/K_m=46,6 M^{-1} s^{-1}$). De plus, les travaux conduits sur la partie C-terminale de l'homologue d'AMSH : AMSH-LP, ont mené à la détermination des constantes enzymatiques et $K_{cat}/K_m= 11,8. 10^3 M^{-1} s^{-1}$ (Sato et al., 2008) ou $156.10^3 M^{-1} s^{-1}$ (Davies et al., 2011). Cette dernière équipe a aussi calculé ces constantes pour la partie C-terminale d'AMSH et obtient une valeur de K_{cat}/K_m de $43,8.10^3 M^{-1} s^{-1}$. Ils concluent alors que le domaine catalytique d'AMSH est moins efficace que celui d'AMSH-LP. Or, la différence des valeurs de K_{cat}/K_m pour AMSH-LP entre les deux équipes, due à la différence de substrat selon Davies et al., est supérieure à celle calculée entre AMSH et AMSH-LP. Ces résultats doivent donc être reproduits afin d'être confirmés ou réfutés et cette étude pourrait être élargie à AMSH FI afin d'obtenir les mêmes informations pour AMSH FI et de vérifier si l'activité enzymatique observée sans activateur durant les études de McCullough et al. et Kim et al. est réelle ou artéfactuelle, pour cela avons réalisé des études cinétiques avec deux techniques différentes : l'observation sur gel SDS-PAGE ou par mesure de fluorescence.

II.2.2 Tests de dé-ubiquitination et interprétation par la méthode SDS-PAGE

La technique de visualisation par gel SDS-PAGE a pour avantage de permettre d'obtenir des résultats rapidement et au sein de notre laboratoire. Elle est aussi moins coûteuse que les études avec un substrat fluorescent et permet de tester une plus grande quantité de combinaisons. Elle est cependant moins précise pour la détermination des constantes cinétiques car elle repose sur une évaluation de l'intensité des bandes et non sur une mesure exacte. Nous avons dans un premier temps testé l'activité d'AMSH seule ou en complexe avec différentes constructions de STAM2.

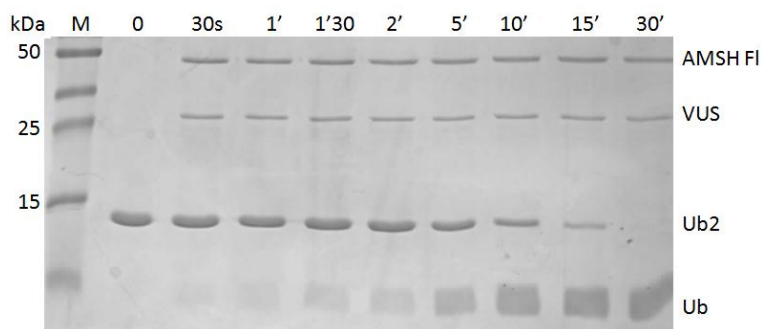


Figure 53 : Test cinétique de dé-ubiquitination de la di-ubiquitine K63 par AMSH FI en complexe avec STAM2 VUS.

La figure 53 représente les résultats typiques obtenus lors des tests de dé-ubiquitination. Ici, alors qu'AMSH est en complexe avec STAM VUS, nous apercevons l'apparition d'une bande de mono-ubiquitine dès 30 secondes. L'intensité des bandes de di-ubiquitine est ensuite calculée grâce au logiciel ImageJ, puis elle est normalisée et la moyenne des triplicats est représentée sous forme de graphique afin de pouvoir comparer les différents tests.

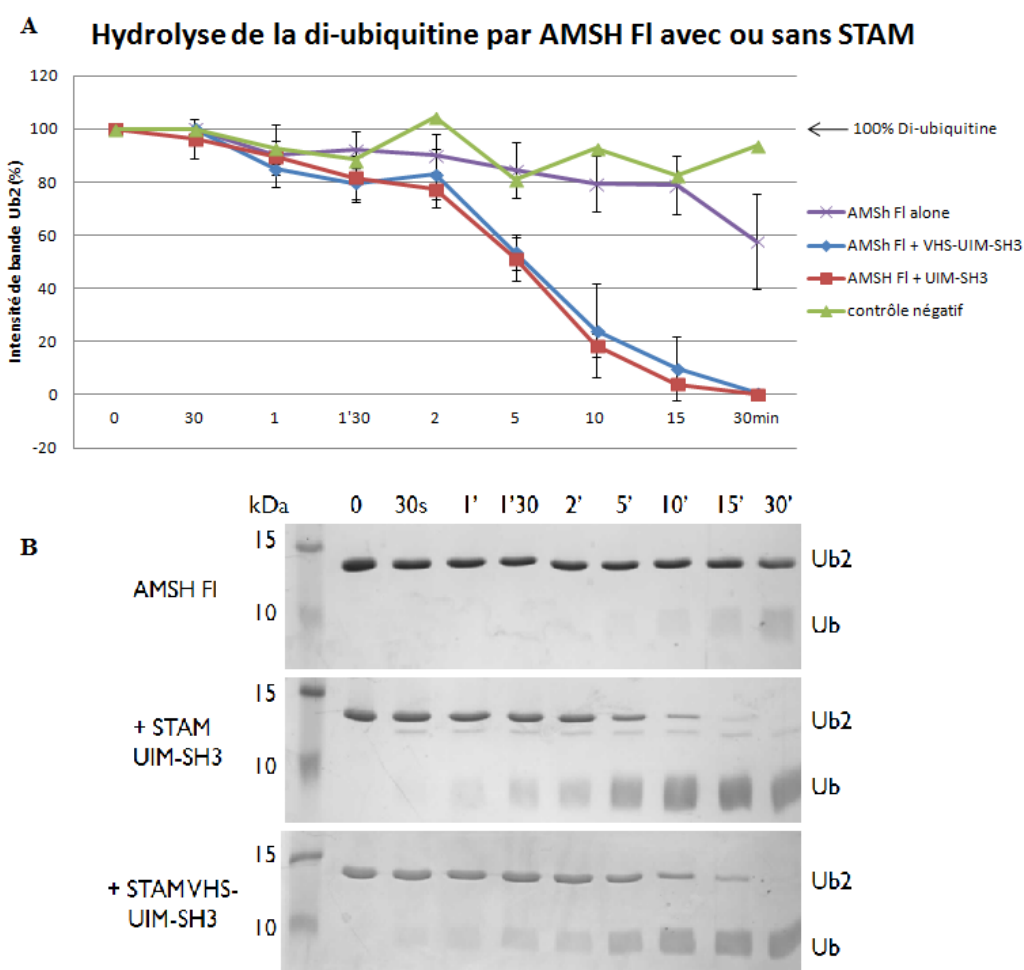


Figure 54 : Essais de dé-ubiquitination par AMSH FI seule ou en complexe avec STAM UIM-SH₃ ou STAM VUS. A) Disparition de la bande de di-ubiquitine K63. B) Apparition de la mono-ubiquitine.

Nous observons dans la figure 54A qu'AMSH FI seule est très peu active. En effet, même après 30 minutes de réaction, moins de 50% de la di-ubiquitine est hydrolysée en ubiquitine (courbe violette). Au contraire, les courbes rouge et bleue, qui représentent la dégradation de la di-ubiquitine par AMSH en complexe avec STAM2 UIM-SH3 ou avec STAM2 VUS, montrent que dès 5 minutes de réaction plus de 50% de la di-ubiquitine a été hydrolysée. Nous pouvons donc conclure qu'AMSH FI seule est une forme inhibée et que STAM est nécessaire pour lever cette inhibition. Cependant, la présence ou non du domaine VHS de STAM2 ne modifie pas son efficacité d'activation. Les gels SDS-PAGE de la figure 54B

permettent de mieux observer l'apparition de la mono-ubiquitine. Ici aussi nous remarquons dès 30 secondes un signal de mono-ubiquitine pour AMSH en complexe avec STAM UIM-SH3 ou VUS alors que ce même signal apparait seulement après 5 minutes pour AMSH FI seule.

II.2.3 Tests de dé-ubiquitination et interprétation par mesure de fluorescence

Nous avons montré dans les paragraphes précédents qu'AMSH FI seule n'est pas ou peu active et que les constructions UIM-SH3 ou VUS de STAM interagissent avec cette enzyme afin de lever l'auto-inhibition. Pour compléter cette étude cinétique de l'activité enzymatique il serait intéressant de déterminer les valeurs du K_m ainsi que du K_{cat} d'AMSH. Pour cela nous avons réalisé des essais de dé-ubiquitination par AMSH FI seule ou en complexe avec STAM2 VUS avec comme substrat de la di-ubiquitine K63 commerciale contenant un fluorophore et une molécule inhibant le signal de fluorescence (appelé « quencher » par la suite) (LifeSensors, Inc.). Quand la di-ubiquitine est intacte, le fluorophore (F) n'émet pas de signal alors que quand le clivage a lieu, le fluorophore s'éloigne du quencher (Q) et peut ainsi produire un signal rouge qui sera enregistré par un spectrophotomètre (figure 55). Le fournisseur propose différents substrats avec des positions de fluorophore et de quencher différentes et confidentielles. Il faut donc tester les six substrats afin de déterminer lequel est le plus approprié pour la suite des expériences.

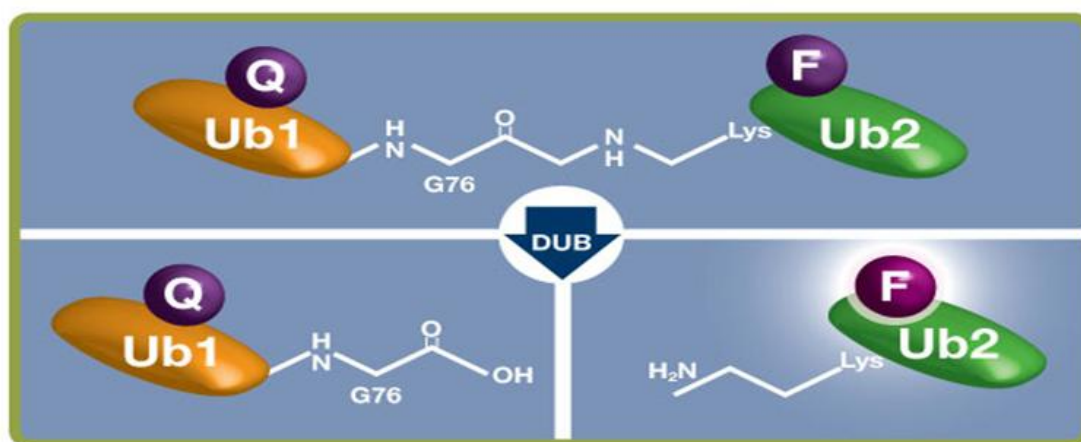


Figure 55 : Schéma de la di-ubiquitine liée K63 fournie par LifeSensors

Le signal émis par la molécule fluorescente est enregistré puis reporté sur un graphique afin de comparer les résultats obtenus pour AMSH FI seule ou en complexe avec STAM VUS et à deux concentrations différentes. Le substrat est à une concentration initiale fixe de 200nM. Ces mesures permettent d'obtenir des résultats beaucoup plus précis que par l'analyse de gels SDS-PAGE et ont été mises en place et réalisées avec l'aide de Caroline Barette et Magda Mortier de l'équipe de Marie-Odile Fauvarque au CEA de Grenoble.

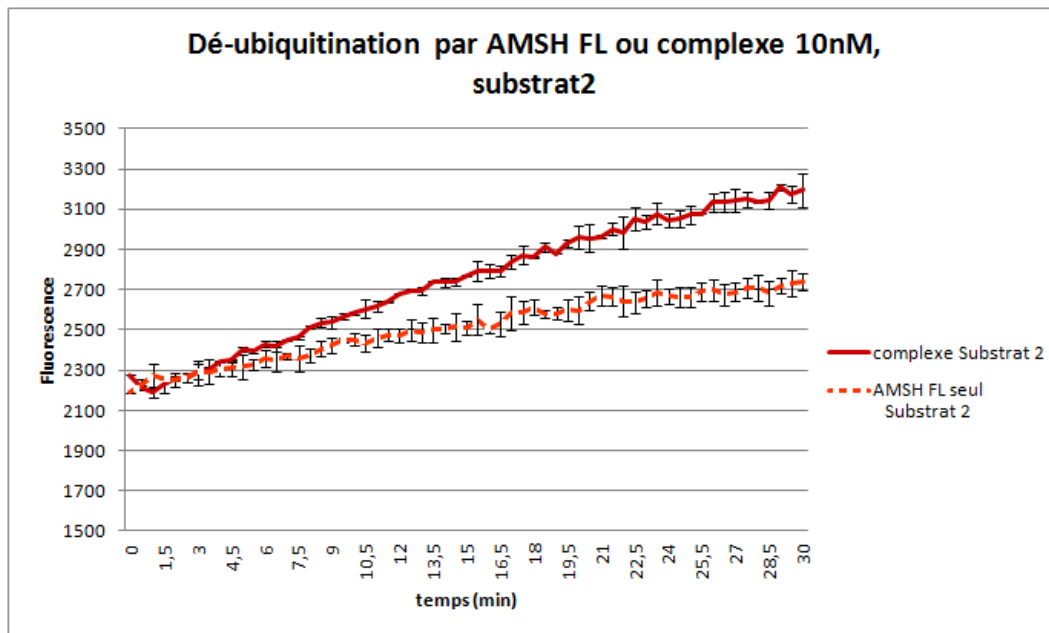
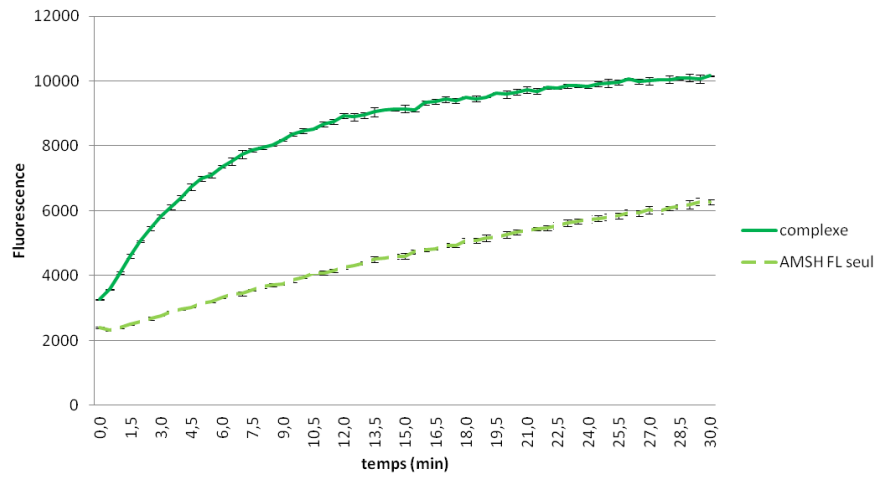
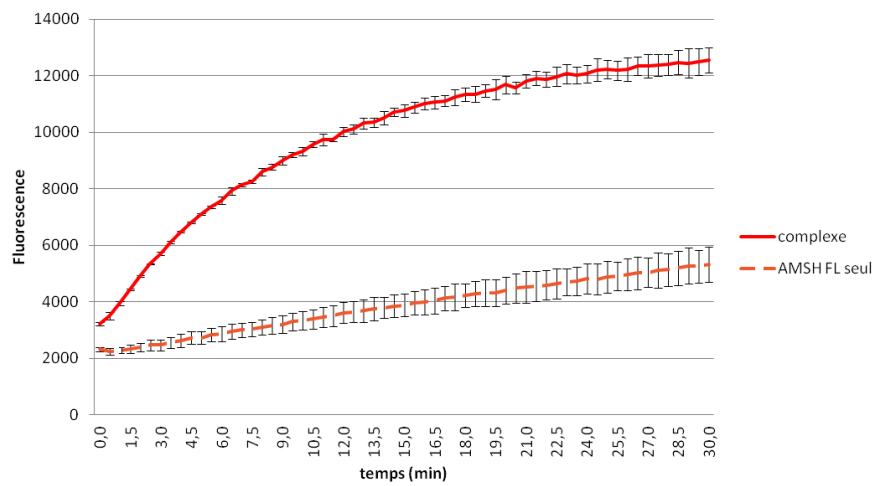
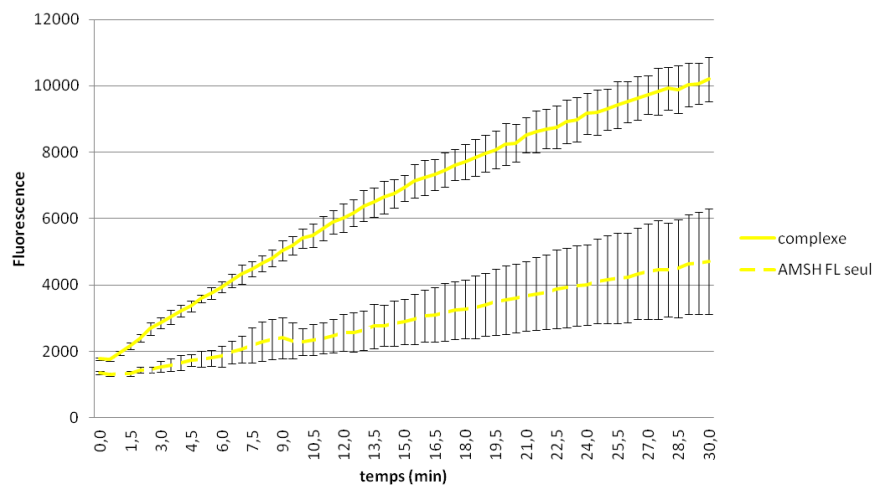


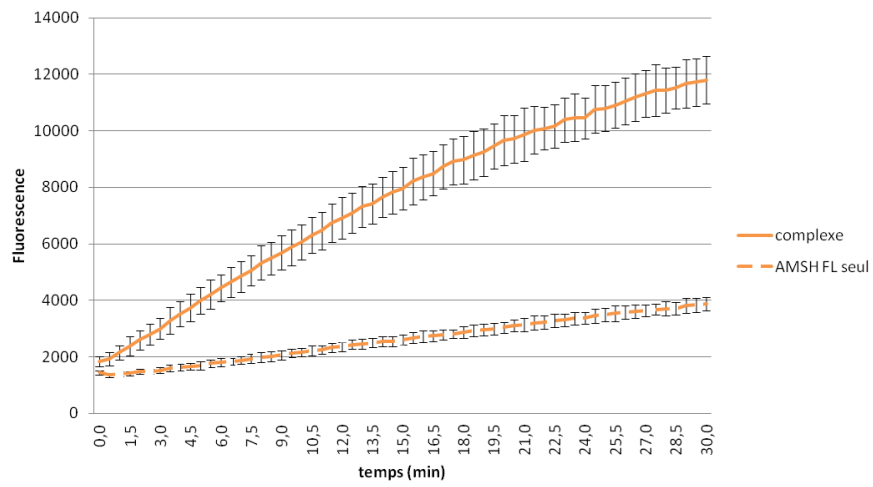
Figure 56 : Exemple de signal obtenu pour la dé-ubiquitination de substrat fluorescent par AMSH Fl seule ou en complexe avec STAM VUS.

Le signal obtenu pour des concentrations protéiques de 10 nM est reporté dans la figure 56. Nous pouvons remarquer que ce signal est très faible et que la réaction n'atteint jamais un plateau. Il est donc difficile d'évaluer le meilleur substrat à cette concentration et nous travaillerons par la suite avec 100 nM de chaque protéine.

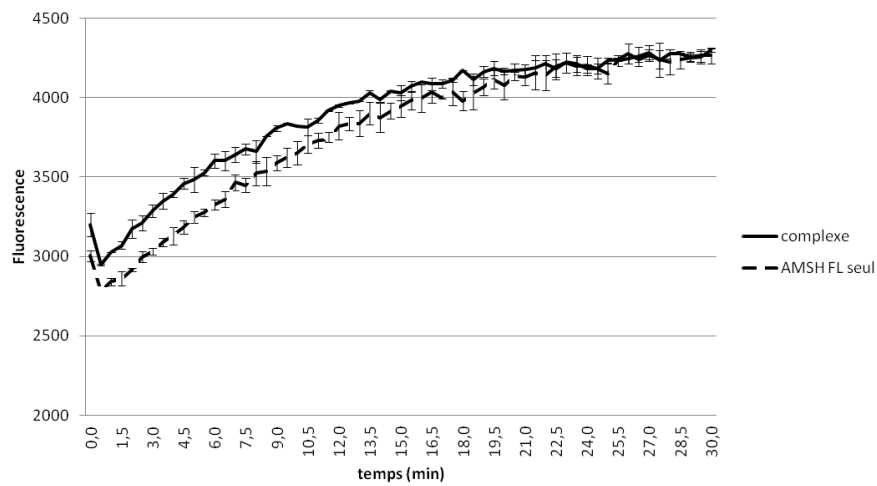
Figure 57 (deux pages suivantes) : Tests d'hydrolyse de la di-ubiquitine liée K63 fluorescente par AMSH Fl ou AMSH Fl/STAM VUS à 100nM. A) Substrat 1. B) Substrat 2. C) Substrat 3. D) Substrat 4. E) Substrat 5. F) Substrat 6.

A**Dé-ubiquitination AMSH FL ou complexe 100nM,
substrat1****B****Dé-ubiquitination AMSH FL ou complexe 100nM,
substrat2****C****Dé-ubiquitination AMSH FL ou complexe 100nM,
substrat3**

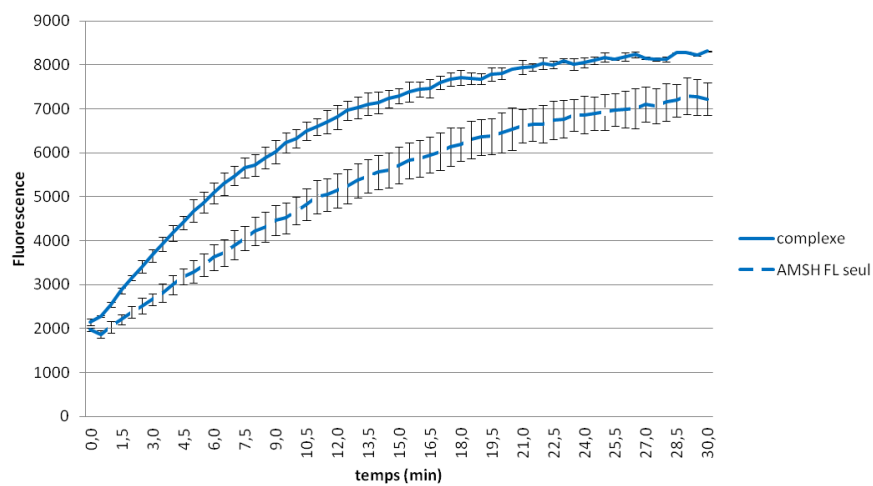
D Dé-ubiquitination AMSH FL ou complexe 100nM, substrat4



E Dé-ubiquitination AMSH FL ou complexe 100nM, substrat5



F Dé-ubiquitination AMSH FL ou complexe 100nM, substrat6



Les tests réalisés avec 100 nM d'enzyme et d'activateur ont une réponse 4 fois supérieure aux tests précédents et, dans certains cas, un plateau est atteint et le substrat est alors totalement digéré par l'enzyme. Certaines réactions montrent une différence marquée entre AMSH FI seule ou AMSH FI en complexe avec STAM2 VUS (A-D) alors que pour les substrats 5 et 6 (E-F) l'activateur n'a pas un effet dramatique (figure 57). Dans le cas du substrat 5, le signal est presque aussi faible que lors des tests à 10 nM d'AMSH, nous pouvons donc conclure que ce substrat ne permet pas une bonne activité ubiquitine-hydrolase d'AMSH probablement à cause d'un encombrement stérique dû à la position du fluorophore ou du quencher. Pour le substrat 6, le signal est presque aussi élevé que pour les autres molécules mais à 10 minutes AMSH FI seule clive presque autant qu'AMSH activée. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en interagissant avec notre enzyme, le fluorophore ou le quencher déplace la partie auto-inhibitrice d'AMSH et permet alors une activité presque optimale, celle-ci serait donc artéfactuelle. Le signal plus important lorsqu'AMSH FI est en présence de STAM2 VUS observé pour les substrats 1 à 4 (courbes A-D) est en accord avec les résultats obtenus précédemment et est un critère important dans le choix du substrat pour la suite des expériences. Le deuxième critère de sélection est la reproductibilité des résultats traduite par les barres d'erreur. Après comparaison de tous ces résultats (figure 58) le substrat 2 est sélectionné pour continuer les expériences.

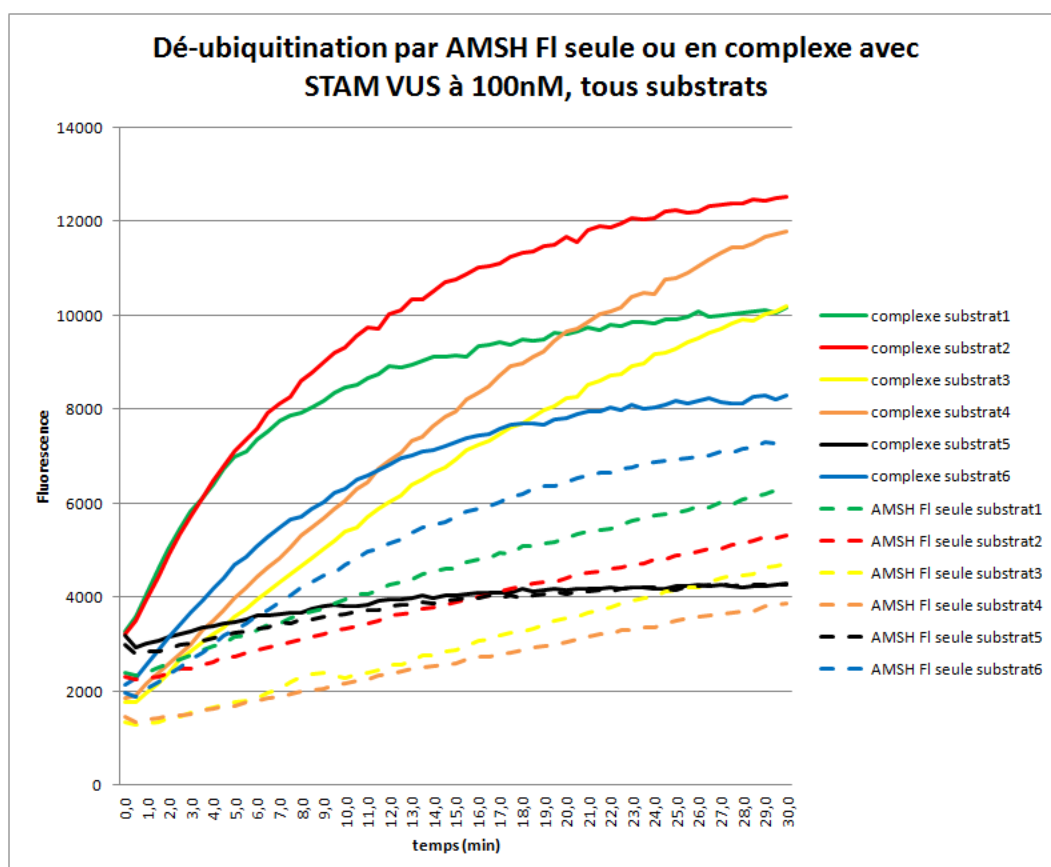


Figure 58 : Comparaison de la dé-ubiquitination de tous les substrats fournis par LifeSensors

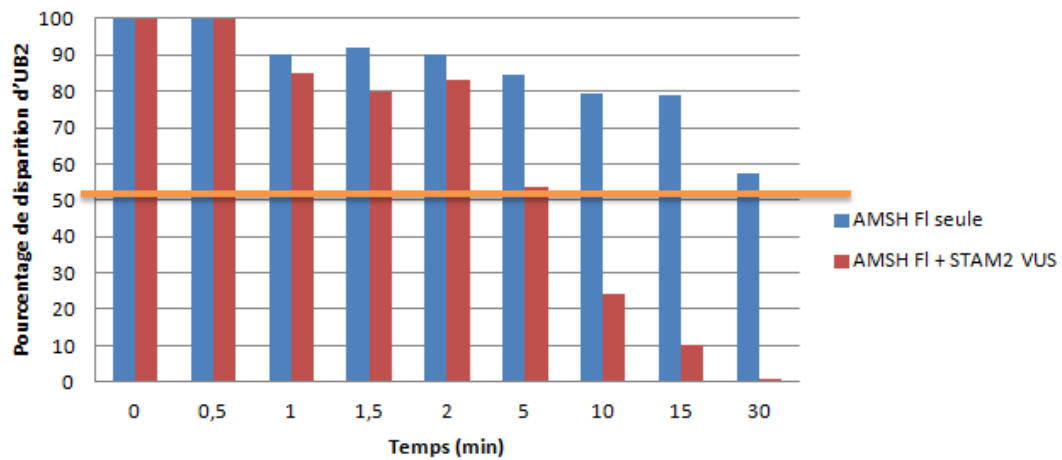
Afin de déterminer quels sont le K_m et le K_{cat} de cette réaction, il est nécessaire de réaliser ces expériences à une concentration fixe en enzyme et de varier la concentration en substrat.

Aussi, pour pouvoir analyser ces résultats et obtenir des valeurs molaires, il faut enregistrer et quantifier le signal que donne une mole d'ubiquitine-fluorophore. Ces expériences n'ont pas encore pu être réalisées.

II.2.4 Comparaison des résultats obtenus en fluorescence et en gel SDS-PAGE

Nous pouvons comparer les résultats obtenus grâce aux deux techniques précédentes afin de vérifier la reproductibilité de nos données. Cependant, le test analysé en gel SDS-PAGE mesure la disparition de la di-ubiquitine alors que le test mesurant la fluorescence est basé sur l'apparition de la mono-ubiquitine. Pour les données de mesure de fluorescence, nous avons donc calculé, pour chaque test enzymatique, la quantité de di-ubiquitine disparue correspondante à l'apparition de mono-ubiquitine. Nous pouvons alors constater que ces expériences produisent des résultats similaires. En effet, dans la figure 59, la barre orange indique le taux de 50% de disparition d'Ub₂ et, pour les deux expériences, AMSH Fl seule ne franchit jamais cette barre alors qu'AMSH Fl en complexe avec STAM2 VUS l'atteint dès 5 minutes de réaction. Cependant, nous remarquons aussi que la diminution des barres du graphique B, traduisant l'apparition de mono-ubiquitine mesurée par fluorescence, est plus régulière que celle du graphique A. Ceci provient d'une plus grande précision des mesures de fluorescence.

A Hydrolyse de la di-ubiquitine K63 par AMSH FI seule ou en complexe avec STAM2 VUS



B Hydrolyse de la di-ubiquitine K63/fluorophore par AMSH FI seule ou en complexe avec STAM2 VUS

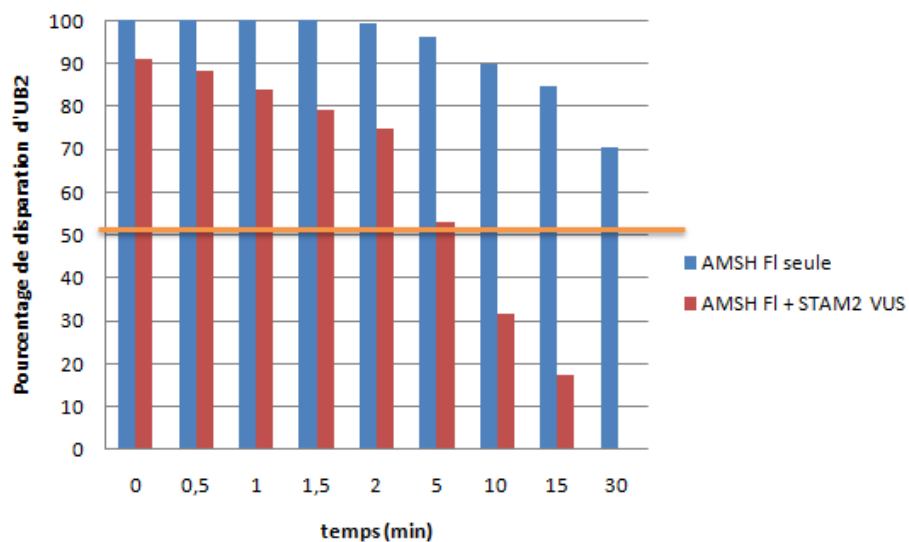


Figure 59 : Comparaison des tests cinétiques de dé-ubiquitination enregistrés par deux techniques différentes. A) Interprétation grâce à un gel SDS-PAGE . B) Interprétation par mesure de fluorescence . VUS : VHS-UIM-SH3

III. AMSH Fl : de la purification à la caractérisation structurale.

III.1. Optimisation du protocole de purification d'AMSH via l'étude de différentes constructions

Aujourd'hui les structures des parties N-terminale et C-terminale d'AMSH sont connues (Davies et al., 2011) (Solomons et al., 2011). Cependant, aucune information à propos de leur arrangement l'une par rapport à l'autre ou de la conformation adoptée par la boucle flexible n'est disponible. Pourtant, ceci permettrait de mieux comprendre le fonctionnement de cette enzyme et plus particulièrement de sa régulation.

Lorsque j'ai commencé à travailler sur ce projet, Julianna Solomons, ancienne doctorante de l'équipe, avait déjà réalisé des tests de solubilité et de pureté sur AMSH Fl avec ou sans étiquette hexa-histidine et exprimée en bactéries ou en cellules d'insecte. La construction exprimée en cellule d'insecte avec une étiquette hexa-histidine était soluble mais facilement dégradée. Avec cette même construction exprimée en cellules *E.coli*, elle obtenait un échantillon sans dégradation mais hétérogène après l'étape de filtration sur gel. Enfin, son dernier essai : AMSH Fl sans étiquette exprimée en bactéries, était soluble mais contaminée par des dégradations. Mon but était donc, à partir de ces résultats préliminaires, d'optimiser cette purification afin de pouvoir cristalliser AMSH Fl et d'obtenir plus d'informations sur l'arrangement de ses différents domaines.

La dégradation d'AMSH Fl, problème majeur lors de la purification, peut être due à une protéolyse spontanée à cause de la flexibilité de la boucle, à une contamination de l'échantillon par des protéases qui auraient facilement accès aux parties flexibles de la protéine ou à une auto-protéolyse aspécifique lorsqu'AMSH est très concentrée. Afin de prévenir ces différents problèmes nous avons mis en place plusieurs stratégies :

- ajout d'anti-protéase lors de la purification : EDTA et/ou pastille anti-protéase (Roche)
- mutation du site actif d'AMSH Fl (D348A)
- clonage, expression et purification de constructions comprenant une boucle plus courte voire aucun des acides aminés de la boucle (link5, BrFl)

III.1.1. AMSH link5 et AMSH D348A

Ces deux constructions d'AMSH ont été étudiées en parallèle et ont permis d'ajouter une étape clef au protocole final de purification d'AMSH Fl. La première étape de la procédure initiale commençait par une lyse par sonication, puis une purification sur colonne échangeuse d'anion Q sépharose avec une élution par un gradient linéaire de NaCl réalisé grâce à un système automatisé (Akta purifier, GE Healthcare). L'étape finale était une filtration sur gel sur colonne S75. (figure 60 et 61)

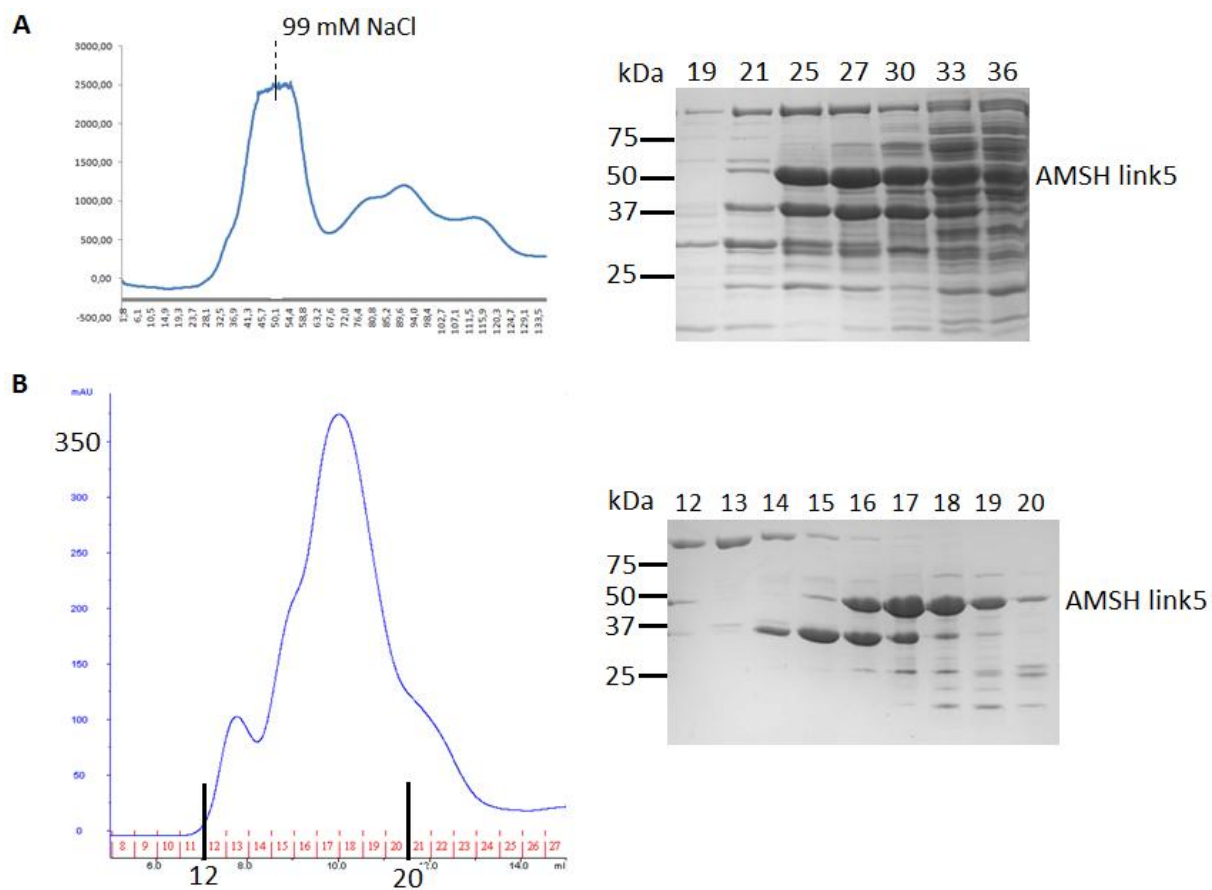


Figure 60 : Premier essai de purification d'AMSH link5. A) Profil d'élution et gel SDS-PAGE de la colonne échangeuse d'anion Q sépharose. B) Profil d'élution et gel SDS-PAGE de filtration sur gel sur colonne S75.

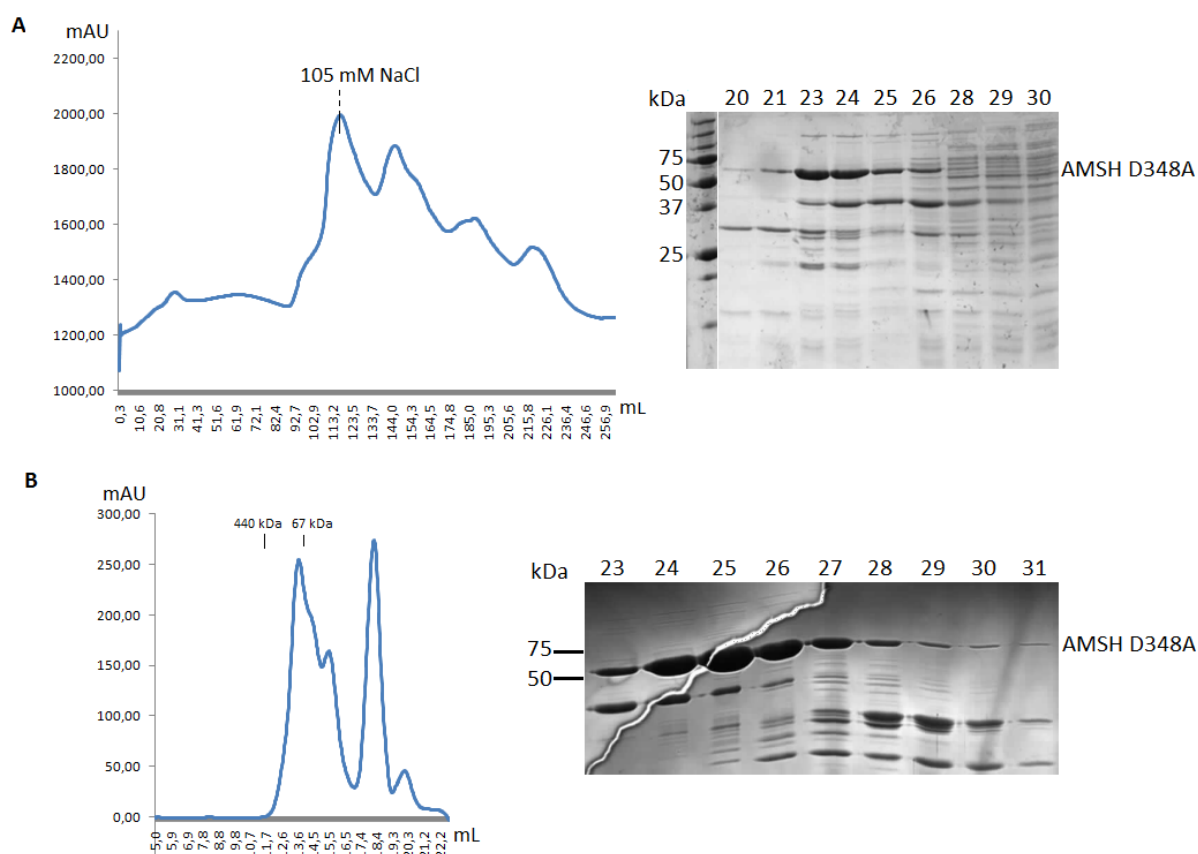


Figure 61 : Premier essai de purification d'AMSH D348A. A) Profil d'élution et gel SDS-PAGE de la colonne échangeuse d'anion Q sépharose. B) Profil d'élution et gel SDS-PAGE de filtration sur gel sur colonne S200.

Comme nous pouvons le remarquer sur les figures 60 et 61, ces étapes de purification ne sont pas suffisantes et de nombreux produits de dégradation persistent après la filtration sur gel. Ce problème provient, entre autre, du fait que l'élution de la colonne d'échangeuse d'anion, à environ 99 mM de NaCl pour AMSH link5 et 105 mM de NaCl pour AMSH D348A, ne permet pas de séparer les contaminants d'AMSH. Nous avons donc modifié cette élution et utilisé un gradient de NaCl par pallier, réalisé avec une pompe péristaltique (figure 62A). Cette étape a permis d'éliminer beaucoup de contaminants et de produits de dégradation (figure 62B). Le profil d'élution de cette colonne montre cependant une certaine hétérogénéité le long du pic principal, probablement due à différentes conformations de notre protéine en solution.

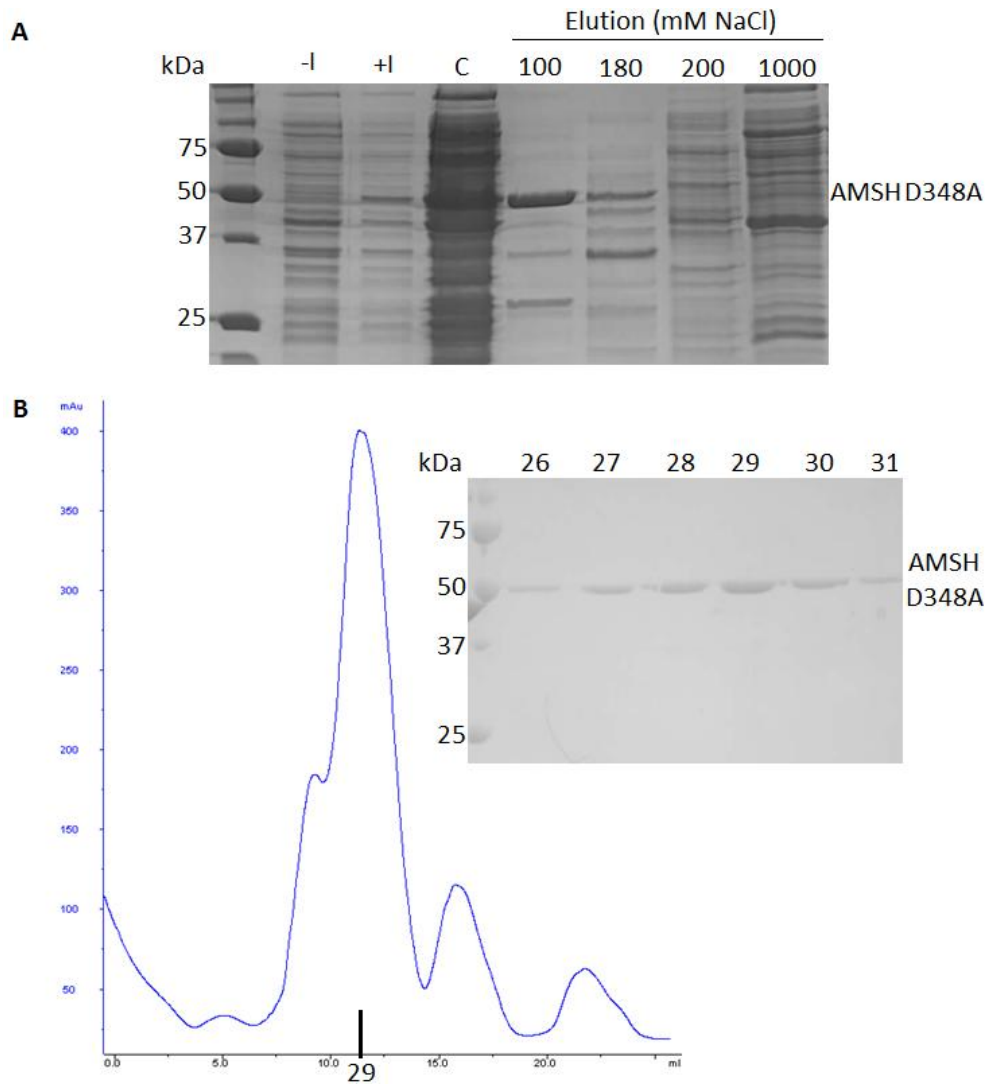


Figure 62 : Purification d'AMSH D348A : élution de colonne échangeuse d'anion Q sépharose avec gradient par palier de NaCl. A) Gel SDS-PAGE de l'élution de la résine Q sépharose. B) Profil d'élution et gel SDS-PAGE de la filtration sur gel.

En parallèle de cette évolution, une autre technique a été utilisée pour AMSH link5 : la précipitation au sulfate d'ammonium. Cette dernière est basée sur la solubilité différentielle des protéines, c'est-à-dire, sur le fait que selon la concentration du sel présent dans la solution, ici le sulfate d'ammonium, certaines protéines auront tendance à précipiter plus que d'autres. Alors, après centrifugation, nous obtiendrons deux phases, le surnageant et le culot. L'idéal est d'obtenir notre protéine dans une phase et les contaminants dans l'autre. C'est ce qui se passe lorsqu'un volume d'AMSH link5 concentrée est mis en contact avec un volume de sulfate d'ammonium à 3M. (figure 63)

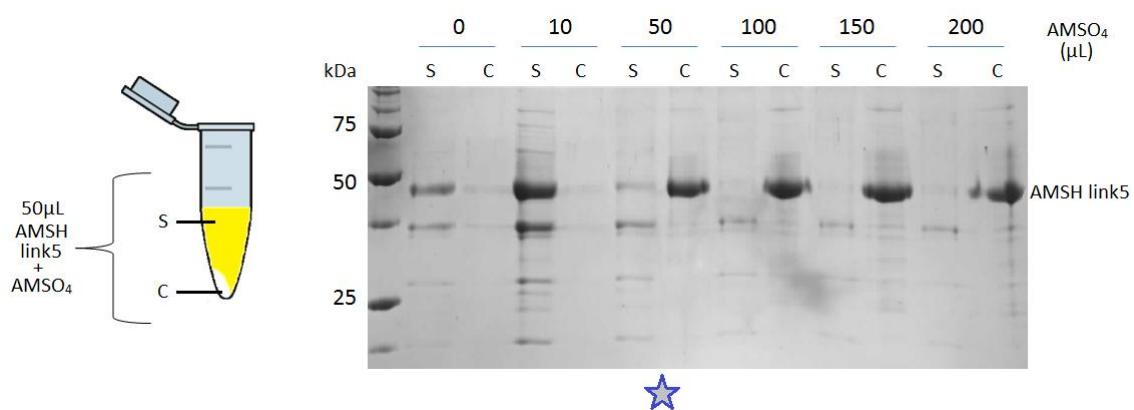


Figure 63 : Test de précipitation d'AMSH link5 par le sulfate d'ammonium. La condition sélectionnée est indiquée par une étoile bleue. S : surnageant, C : Culot

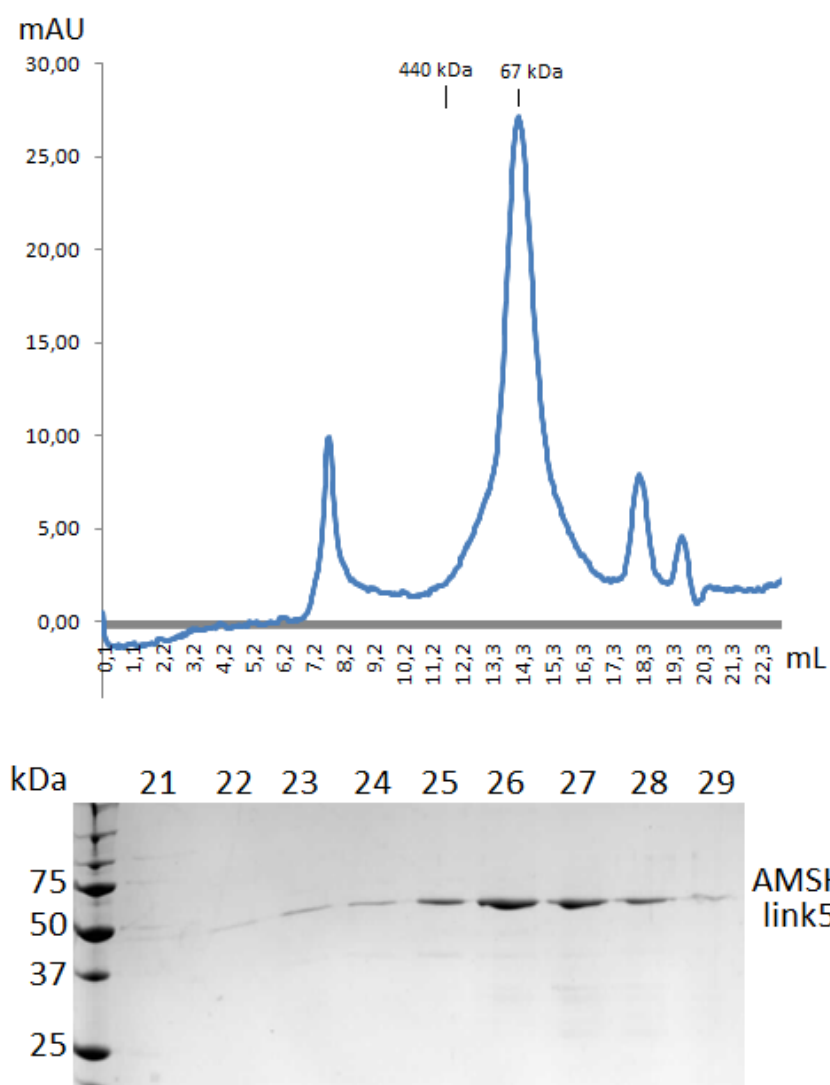


Figure 64 : Filtration sur gel d'AMSH link5 après amélioration du protocole. Haut : Profil d'élution d'AMSH link5 sur colonne de filtration sur gel. Bas : Gel SDS-PAGE correspondant à l'élution d'AMSH link5.

L'évolution d'un gradient linéaire vers un gradient en palier et l'ajout de l'étape de purification au sulfate d'ammonium ont permis d'améliorer considérablement la qualité de notre échantillon (figure 64). Cependant, AMSH link5 reste très hétérogène. En effet, des mesures de DLS (Dynamic Light Scattering) ont montré que même à une concentration de $0,56 \text{ mg.mL}^{-1}$, AMSH link5 a une polydispersité de 60%. Nous avons donc poursuivi avec AMSH D348A uniquement, que nous avons envoyé à la plateforme de cristallisation à haut débit de l'EMBL de Grenoble à une concentration maximale de $4,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ mais sans succès (figure 65). Pourtant, malgré une légère épaule visible sur le profil d'élution de la purification par filtration sur gel, cet échantillon avait une polydispersité de 14,8 % donc, en dessous du seuil des 20% généralement tolérés. Au delà de cette concentration une forte agrégation est observée dans de nombreux puits, nous sommes donc à la limite de solubilité. Nous pouvons cependant mettre à profit les informations acquises et les appliquer à la purification d'AMSH Fl.

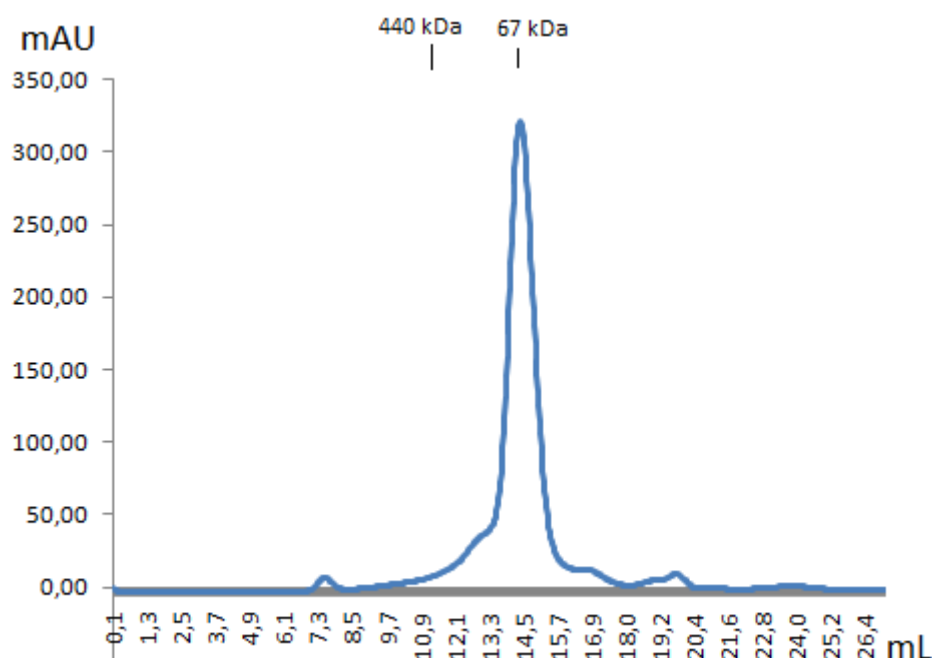


Figure 65 : Profil d'élution d'AMSH D348A utilisée pour des essais de cristallisation

III.1.2. AMSH Fl

Grâce aux optimisations de protocole décrites précédemment, nous pouvons envisager à nouveau de purifier et cristalliser AMSH Fl. Lors de l'étape finale de filtration sur gel sur colonne S75, AMSH élue à un volume d'environ 8,5 mL, ce qui correspondrait à une forme monomérique mais très allongée. Cet échantillon est ensuite transmis à la plateforme de cristallisation à haut débit de l'EMBL Grenoble à des concentrations allant jusqu'à 5 mg.mL^{-1} . Lors de mesures de DLS nous avons constaté qu'à cette concentration l'échantillon a une polydispersité de 22 % et que celle-ci augmentait avec la concentration (à partir de 17% à 1 mg.mL^{-1}). De plus, lorsque nous analysons cet échantillon sur gel natif nous remarquons qu'une hétérogénéité persiste. Il se peut qu'AMSH adopte différentes conformations en

solution ou que des dégradations de cette protéine restent attachées à la forme entière et que cette hétérogénéité empêche la cristallisation. En effet, lors de certains essais de purification nous avons observé des bandes de dégradations plus petites qu'AMSH FI mais éluant dans le même pic. Ce résultat peut indiquer qu'AMSH serait capable d'interagir avec elle-même mais nous n'avons pu démontrer cette hypothèse avec certitude.

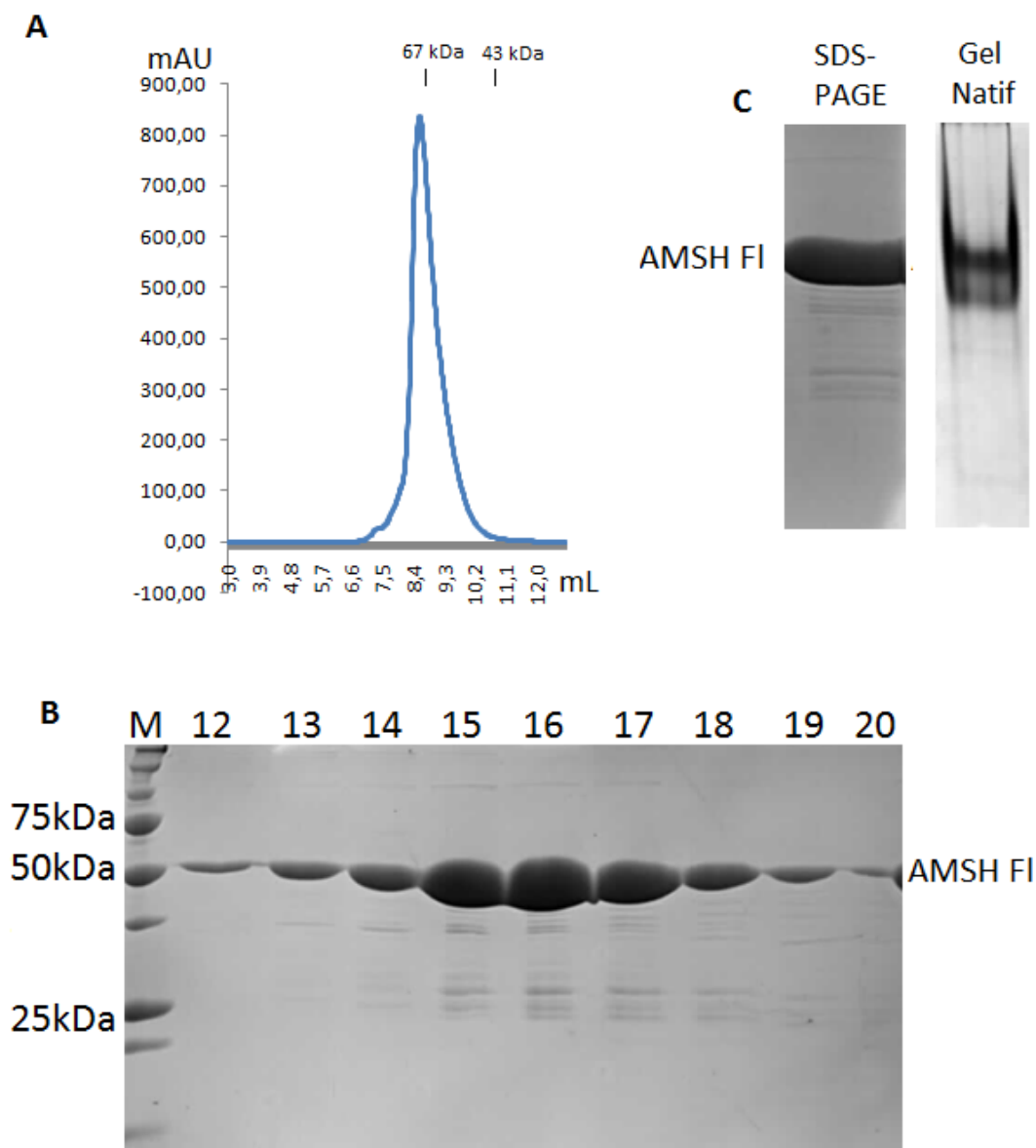


Figure 66 : Purification d'AMSH FI. A) Profil d'élution de filtration sur gel. B) Gel SDS-PAGE correspondant à l'élution A. C) Echantillon concentré et utilisé pour la cristallologène chargé sur gel SDS-PAGE et gel natif.

Peu de conditions ont donné des résultats positifs et les conditions pour lesquelles un espoir était apparu au robot de cristallisation ont été reproduites à la main par la technique de diffusion de vapeur en goutte suspendue mais n'ont pas permis d'obtenir de nouveaux cristaux. Nous avons essayé de pêcher ces cristaux afin de les congeler et d'analyser leur

diffraction des rayons X mais ces derniers étaient trop fragiles et se sont dissous très rapidement (figure 67).

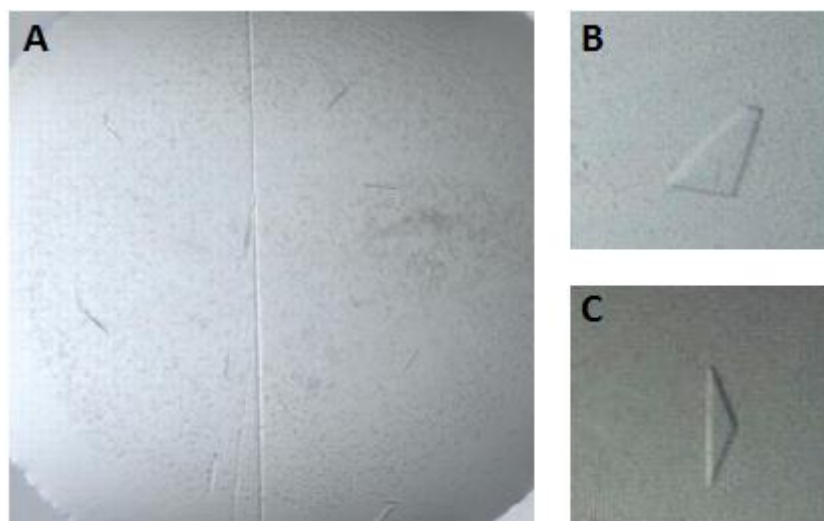


Figure 67 : Résultats positifs obtenus grâce au robot de cristallisation à haut débit de l'EMBL pour AMSH Fl. A) 0.20M sulfate de lithium, 0.1M bis-tris pH5.5, 25 % PEG3350, 4°C. B) 0.2M chlorure de lithium pH6,7, 20% PEG3350. C) 0.2M formate de sodium, 20% PEG3350.

Cependant, après des affinements et des recherches réalisés à la main autour de plusieurs conditions, des cristaux se sont formés dans une des compositions (figure 68). Cette solution, présente dans le réservoir et composée de fluorure d'ammonium (250 à 275 mM) et de PEG3350 (30 à 36%) est mélangée au rapport volumique 1 :1 avec AMSH Fl à 2,2 mg.mL⁻¹. Nous obtenons alors des cristaux hexagonaux. Ces cristaux ont été lavés, dissous et chargés sur gel SDS-PAGE. Une faible bande correspondant à AMSH Fl était visible sur ce gel et c'est pourquoi nous avons enregistré leur cliché de diffraction des rayons X. Malheureusement ce dernier contient peu de taches, très intenses et espacées ce qui est caractéristique d'une diffraction de cristal de sel. Nous avons donc cristallisé du fluorure d'ammonium.

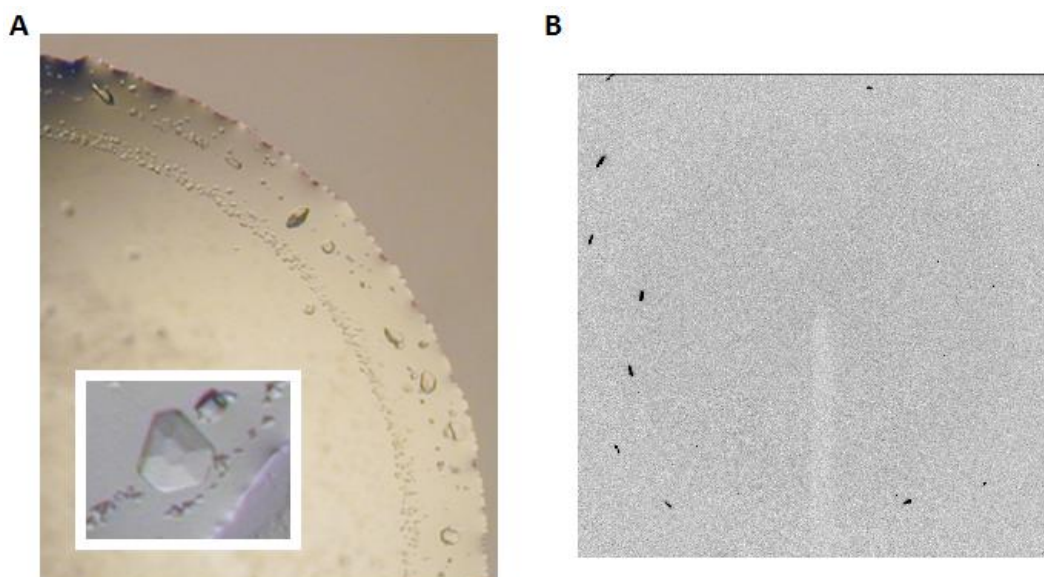


Figure 68 : Résultats obtenus lors d'essais de cristallisation d'AMSH Fl. A) Cristaux de fluorure d'ammonium. B) Cliché de diffraction.

Malgré nos efforts nous n'avons jamais pu cristalliser AMSH Fl. Pourtant les parties C-terminale et N-terminale ont toutes deux été cristallisées et leur structure a été résolue par analyse de diffraction aux rayons X (Solomons et al., 2011) (Davies et al., 2011). Ceci indique que la partie supplémentaire de notre construction, c'est-à-dire la boucle flexible, apporte trop d'instabilité et de flexibilité. Nous avons donc décidé de travailler sur de nouvelles constructions.

III.1.3. AMSH EKE et AMSH Fl lys met

Comme nous ne pouvions pas cristalliser un échantillon pur d'AMSH Fl et comme sa séquence primaire contient beaucoup de résidus hydrophiles (notamment des lysines), nous avons essayé de diminuer la solubilité de cette protéine et donc de faciliter les rencontres entre les molécules en limitant les répulsions inter-protéines afin d'augmenter les chances de cristallisation. Pour cela nous avons élaboré deux stratégies : la mutation des résidus d'une zone hydrophile à la surface de la protéine ou la méthylation des lysines.

AMSH EKE :

En 1999, deux équipes ont montré par des analyses statistiques que les lysines (K) et les acides glutamiques (E) étaient majoritairement localisés en surface et peu fréquemment retrouvés dans des interfaces protéine-protéine (Baud et Karlin, 1999) (Conte et al., 1999). Ce sont donc ces résidus que le serveur SERp (<http://services.mbi.ucla.edu/SER/>) propose de muter en alanine afin de diminuer l'entropie et de favoriser la cristallisation.

AMSH contient 31 lysines et 43 acides glutamiques ce qui représente au total plus d'un sixième de sa séquence primaire. Nous avons donc soumis cette séquence à une analyse par le

serveur SERp et celui-ci nous a proposé de muter trois zones en alanine : les lysines K125 à K127, les résidus E 175, K176 et K 177 ou les résidus K144, E145 et K146 (figure 69).

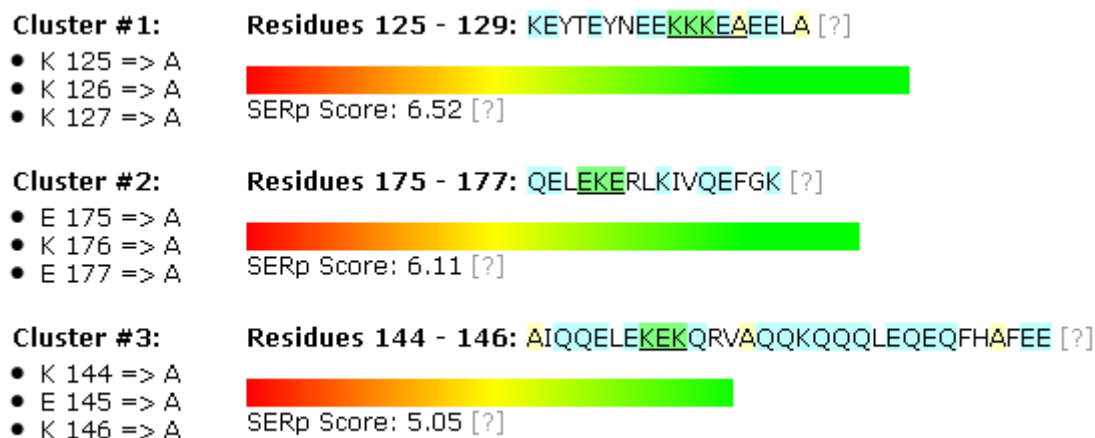


Figure 69 : Résultat de l'analyse de la séquence primaire d'AMSH par le serveur SERp. SERp Score : un score est attribué à chaque résidu de la séquence en fonction de son entropie puis la moyenne est calculée. Plus cette moyenne est élevée, plus la nouvelle séquence est optimale pour une amélioration de cristallisation.

Parmi ces trois zones, deux font partie de la structure du domaine MIT d'AMSH en complexe avec le domaine MIM de CHMP3 cristallisé par Julianna et ne sont donc pas un frein majeur à la cristallisation. C'est pourquoi nous avons décidé de muter en priorité la zone numéro 2 : 175 EKE 177 en alanines.

Après les modifications réalisées, nous avons inséré AMSH FI EKE dans le vecteur pASK-IBA-43+ afin de la purifier selon le même protocole qu'AMSH FI. Cependant, lors du premier essai, nous avons constaté que la bande correspondant à AMSH EKE sur gel SDS-PAGE ou par western-blot avec des anticorps anti-AMSH, était majoritairement présente dans la fraction non retenue ou le lavage avec le tampon de lyse et très peu présente dans les fractions d'élution à 50 ou 75 mM de NaCl (figure 70A et B). Nous avons donc augmenté le pH et supprimé le sel du tampon de lyse afin d'optimiser l'accroche de notre protéine à la résine de Q sépharose. Comme nous pouvons le voir sur la figure 70C, ces modifications n'ont pas apporté d'amélioration. Cela confirme que les résidus 175 EKE 177 étaient bien en surface et nous pouvons penser qu'ils participaient à l'interaction AMSH/résine Q sépharose. Afin de tout de même étudier cette protéine, nous avons envisagé le clonage du gène AMSH EKE dans un vecteur d'expression bactérienne contenant une étiquette hexa-histidine ajoutée à l'extrémité C-terminale de la protéine et celui-ci est en cours.

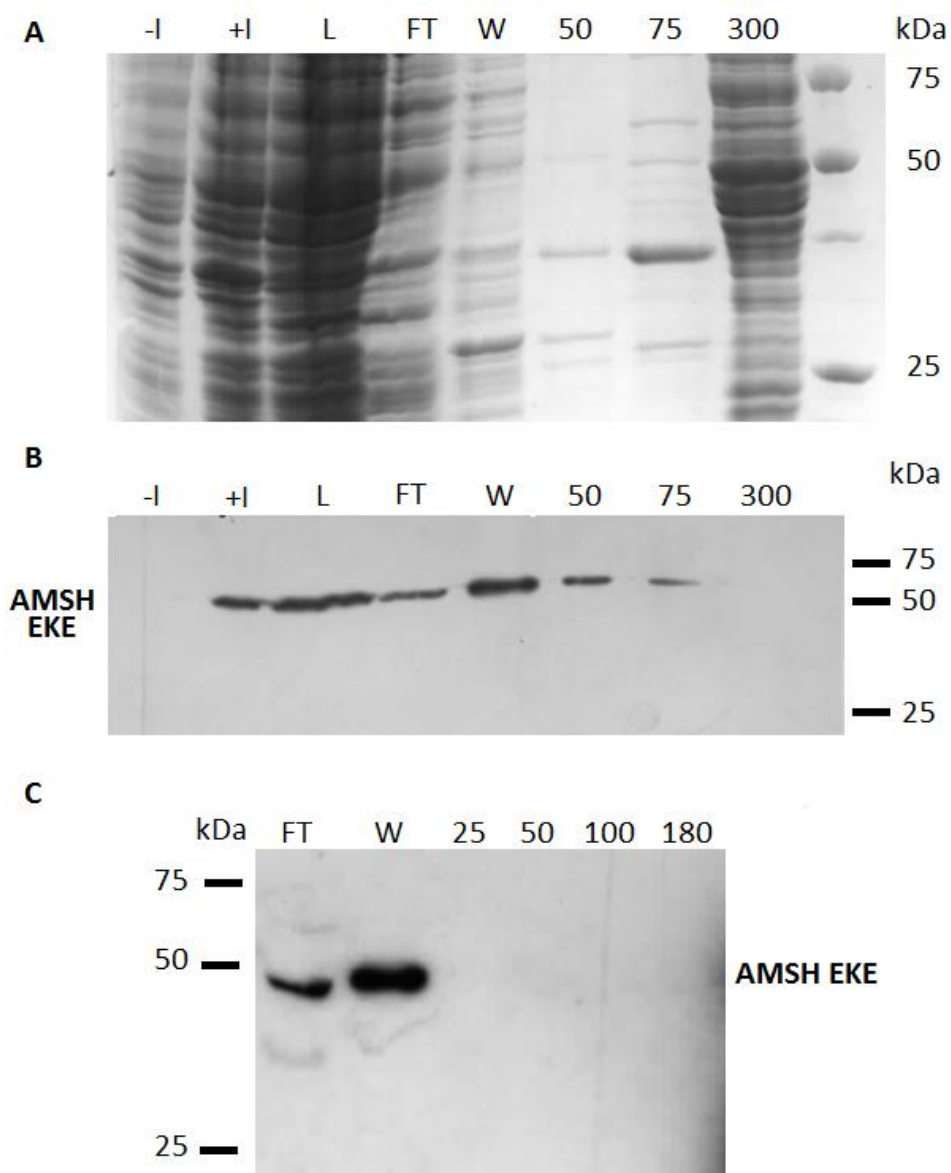


Figure 70 : Essai de purification d'AMSH EKE par colonne échangeuse d'anion Q sépharose. A) Gel SDS-PAGE du premier essai avec le tampon de lyse d'AMSH Fl (pH 8, 25 mM NaCl). B) Western-blot avec anticorps anti-AMSH correspondant au gel SDS-PAGE A. C) Western-blot avec anticorps anti-AMSH du deuxième essai de la purification avec tampon de lyse sans sel et à pH 8,5. I : induction, FT : non accroché, W : lavage.

AMSH Fl lys met :

La méthylation de lysines est une autre technique qui permet de réduire la solubilité des protéines et ainsi d'augmenter les chances de cristallisation (Walter et al., 2006). AMSH Fl est purifiée comme précédemment jusqu'à l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium puis elle est resuspendue dans du tampon de méthylation. Après le procédé, qui dure au total une nuit, AMSH est purifiée par filtration sur gel puis sur échangeuse d'anion Mono Q avant une dernière filtration sur gel. Comme nous pouvons le remarquer dans la figure 71, à la fin de ce protocole nous obtenons une protéine sans contaminants et soluble, et l'échantillon

paraît homogène sur gel natif. Celui-ci a donc été confié à la plateforme de cristallisation à haut débit de l'EMBL à une concentration de $3,8 \text{ mg.ml}^{-1}$ mais seuls des cristaux de sels ont été observés.

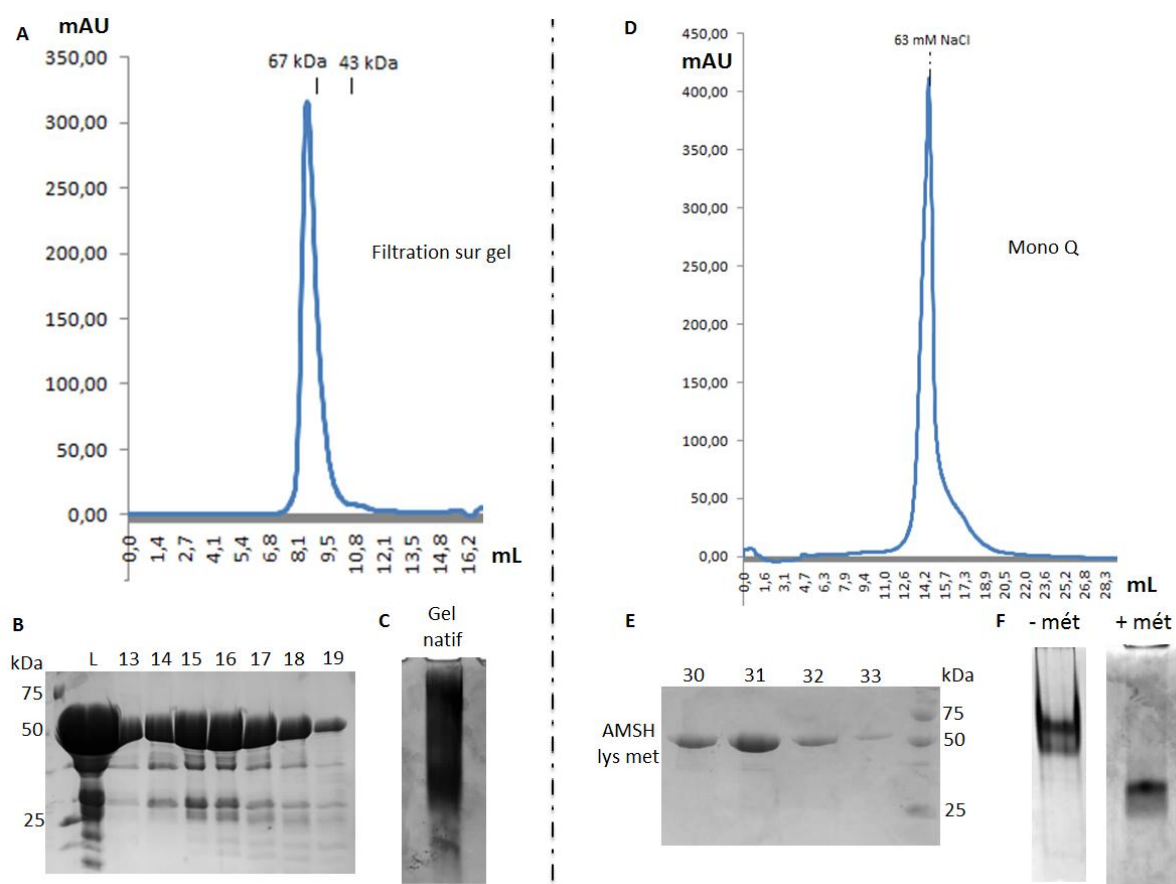


Figure 71 : Purification d'AMSH Fl lys met, première filtration sur gel et colonne échangeuse d'anion Mono Q. A) Profil d'élution de la première filtration sur gel. B) Gel SDS-PAGE correspondant à l'élution en A. C) Gel natif correspondant à la fraction 16 de la figure A et B. D) Profil d'élution de la colonne échangeuse d'anion Mono Q. E) Gel SDS-PAGE correspondant à l'élution D. F) Comparaison sur gel natif de l'échantillon avant et après méthylation. Mét : méthylation

III.1.4. AMSH BrFl : à la recherche d'un homologue d'AMSH Fl

La diminution des répulsions entre protéines au sein de notre échantillon n'a pas permis de cristalliser AMSH Fl humain, ni d'obtenir des informations structurales à l'échelle atomique. Nous pourrions cependant travailler sur une forme plus courte de cette protéine ne contenant pas la boucle flexible qui empêche probablement la formation d'un cristal. C'est pourquoi nous avons réalisé une étude bioinformatique afin d'identifier un tel homologue d'AMSH. Tout d'abord nous avons obtenu la liste des homologues connus d'AMSH sur le site String (<http://string-db.org/>). Celle-ci contenait 50 protéines dont la moitié était des homologues

d'AMSH-LP et non d'AMSH. Ensuite, les protéines trop proches d'AMSH humain (provenant du singe, du chien, du chat et autres mammifères) contenaient toutes la boucle dont nous ne voulions pas, ces homologues ont donc été écartés. Finalement, nous avons aligné les séquences des protéines restantes, vérifié la conservation des acides aminés importants pour la liaison à CHMP3 et ceux importants pour l'activité enzymatique d'AMSH et comparé leur prédiction de structure fournie par le logiciel GlobPlot (<http://globplot.embl.de/>) afin de sélectionner le meilleur candidat. (figures 72 et 73)

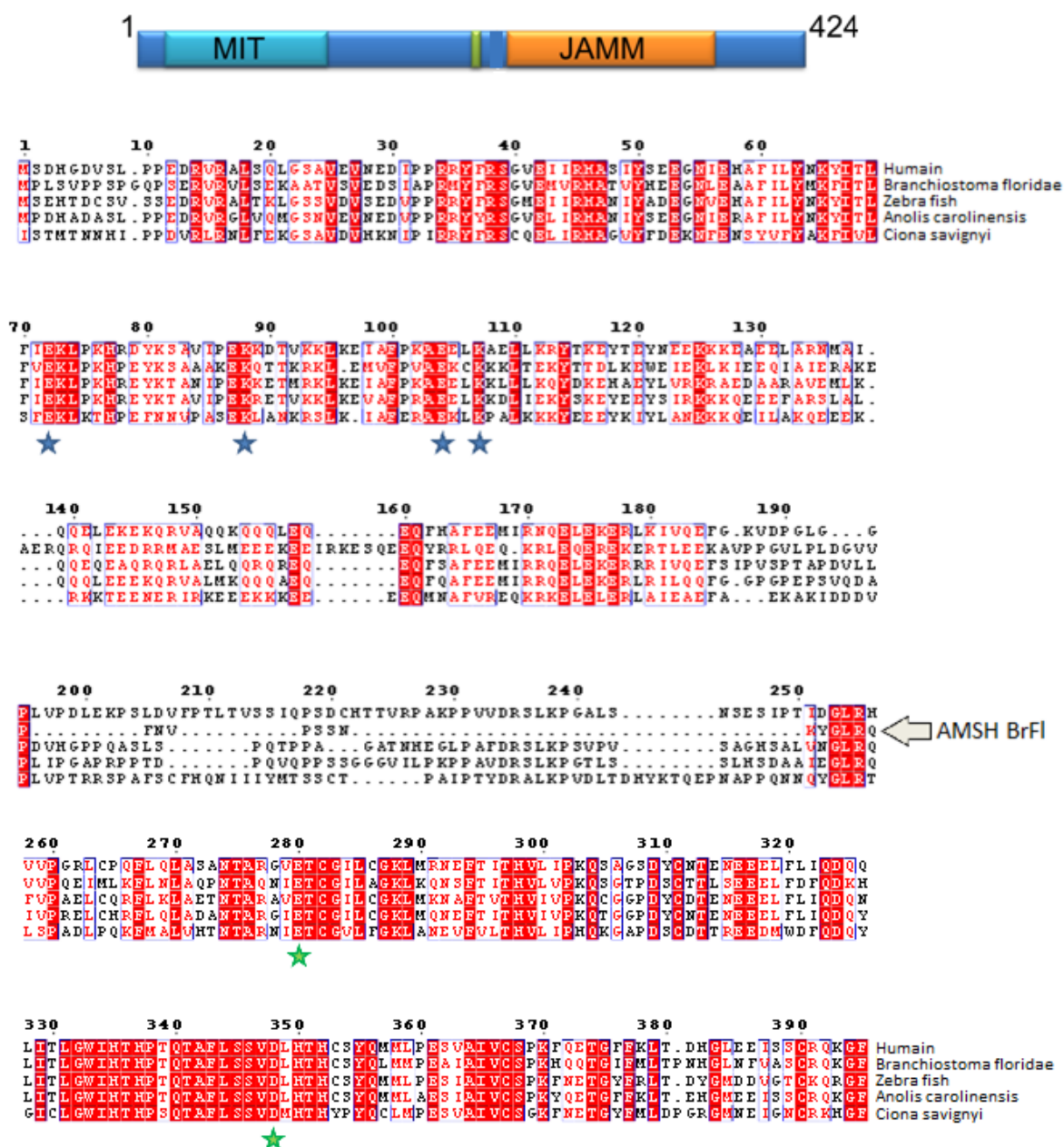


Figure 72 : Alignement des séquences C-terminales d'AMSH humain et ses homologues chez Anolis carolinensis, Zebra fish, Branchiostoma floridae et Ciona savignyi. Etoile verte : résidus important pour l'activité enzymatique, Etoile bleue : résidus important pour la liaison à CHMP3.

La figure 72 montre l'alignement de séquence d'AMSH et de ses homologues chez différentes espèces. Nous pouvons constater une grande conservation de séquence des domaines N-terminal et C-terminal et plus particulièrement des résidus importants pour la liaison à CHMP3, indiqués par une étoile bleue, ainsi que ceux nécessaires à l'activité enzymatique d'AMSH, indiqués par une étoile vert. Ceci reflète l'importance des interactions réalisées par le domaine MIT d'AMSH ainsi que la conservation de son activité enzymatique au sein de l'évolution. Cependant, la région centrale, qui correspond à la boucle prédite non-structurée d'AMSH et à la zone d'interaction avec STAM n'est pas conservée. Elle est même absente dans certains organismes comme l'urochordée *Branchiostoma floridae*. Ceci pourrait indiquer que la nécessité pour l'activité enzymatique d'AMSH de lier la sous-unité STAM du complexe ESCRT-0 est apparue plus tard au cours de l'évolution et qu'elle constitue un niveau de régulation avancé.

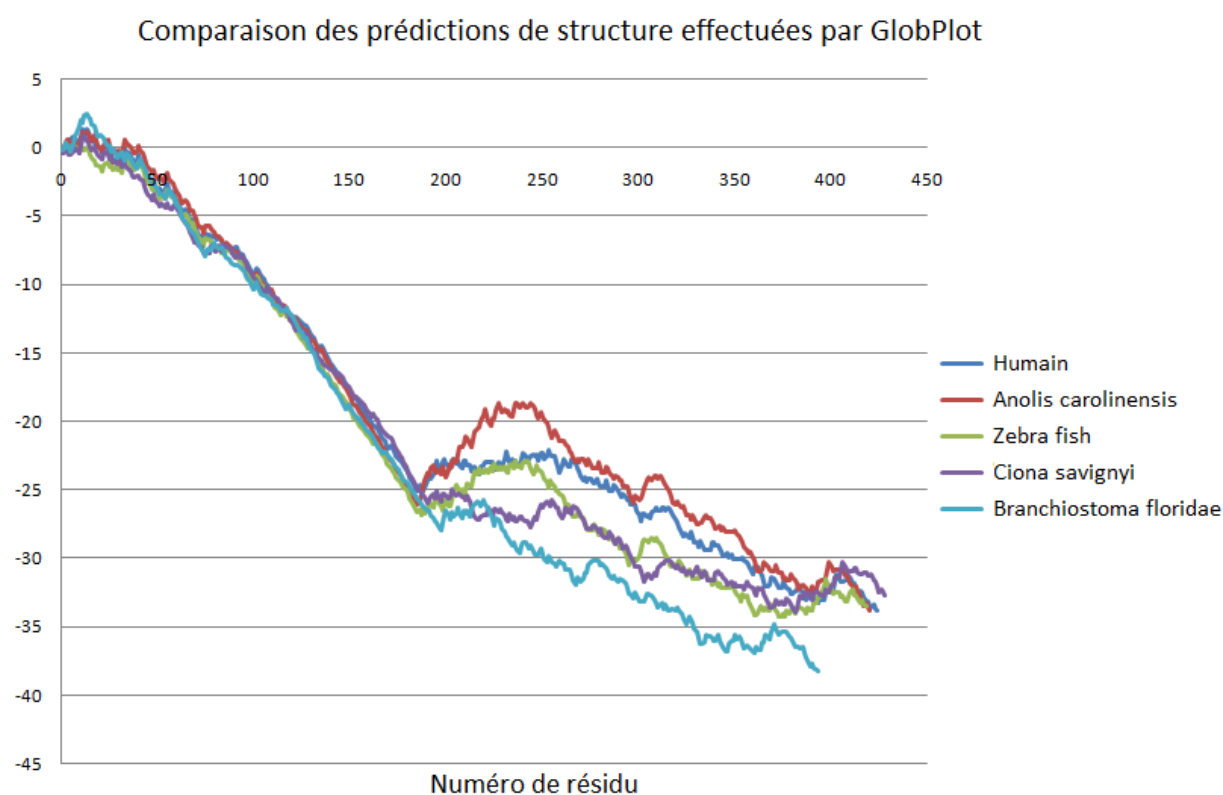


Figure 73 : Prédiction de structure par le serveur GlobPlot d'AMSH humain et ses homologues chez *Anolis carolinensis*, *Zebra fish*, *Ciona savignyi* et *Branchiostoma floridae*.

En comparant toutes ces données nous observons que l'homologue d'AMSH chez *Branchiostoma floridae* possède les résidus nécessaires à la liaison avec CHMP3 et à l'activité enzymatique, ne contient pas la boucle flexible et a une prédiction de structure plus stable. En effet, sur les graphiques obtenus grâce à GlobPlot, une pente négative représente un domaine ordonné et une pente positive une partie désordonnée. Nous retrouvons chez tous les homologues d'AMSH les deux pentes négatives correspondant aux domaines N-terminal et C-terminal de la protéine mais AMSH de *Branchiostoma floridae* est la seule à ne pas avoir une courbe qui remonte entre les résidus 180 à 240 et qui est globalement en dessous de toutes les

autres. Nous avons donc choisi de cloner et de tenter de purifier cette protéine. Le clonage, confié à un stagiaire sous ma responsabilité, est en cours.

III.2. Etude de diffusion de rayons X aux petits angles

Nous avons utilisé la technique de diffusion de rayons X aux petits angles pour déterminer l'enveloppe globale de la structure d'AMSH seule ou en complexe avec STAM VUS ou CHMP3 en solution. En effet, cette technique permet d'obtenir des modèles de structures à basse résolution et il est ainsi possible de modéliser l'organisation de différents domaines, d'observer de grands changements conformationnels ou des réorganisations de structure lors de la formation d'un complexe. Ce travail et l'analyse des données ont été réalisés en collaboration avec le Dr. Jens Radzimanowski, post doctorant dans notre équipe.

AMSH

AMSH a été purifiée telle que décrit auparavant et des données de diffusion de rayons X aux petits angles ont été enregistrées à trois concentrations : 0,5, 1 et 1,5 mg.mL⁻¹.

Après avoir utilisé, pour chaque jeu de données, la moyenne des dix courbes enregistrées et soustrait la courbe correspondant au tampon, nous n'avons observé aucune précipitation pour l'échantillon le plus concentré. Nous avons donc regroupé les différentes courbes et conservé la courbe de l'échantillon le moins concentré pour les petits angles et celle de l'échantillon le plus concentré pour les plus grands angles. Ainsi, nous obtenons une courbe représentative de notre protéine en solution avec le meilleur rapport bruit/signal (figure 74A). Grâce à cette courbe et à l'approximation de Guinier, nous avons pu calculer la fonction de distribution des distances $P(r)$, ainsi que le rayon de giration R_g et le diamètre maximum D_{max} . Ces données, indiquées dans la figure 74B-D, ont été utilisées par la suite pour construire un modèle *ab initio*. Alors, deux stratégies ont été mises en place en parallèle : l'obtention d'une enveloppe moyenne représentant les molécules en solution grâce aux logiciels DAMMIN et DAMMIF et la réalisation d'un modèle à basse résolution grâce au logiciel BUNCH.

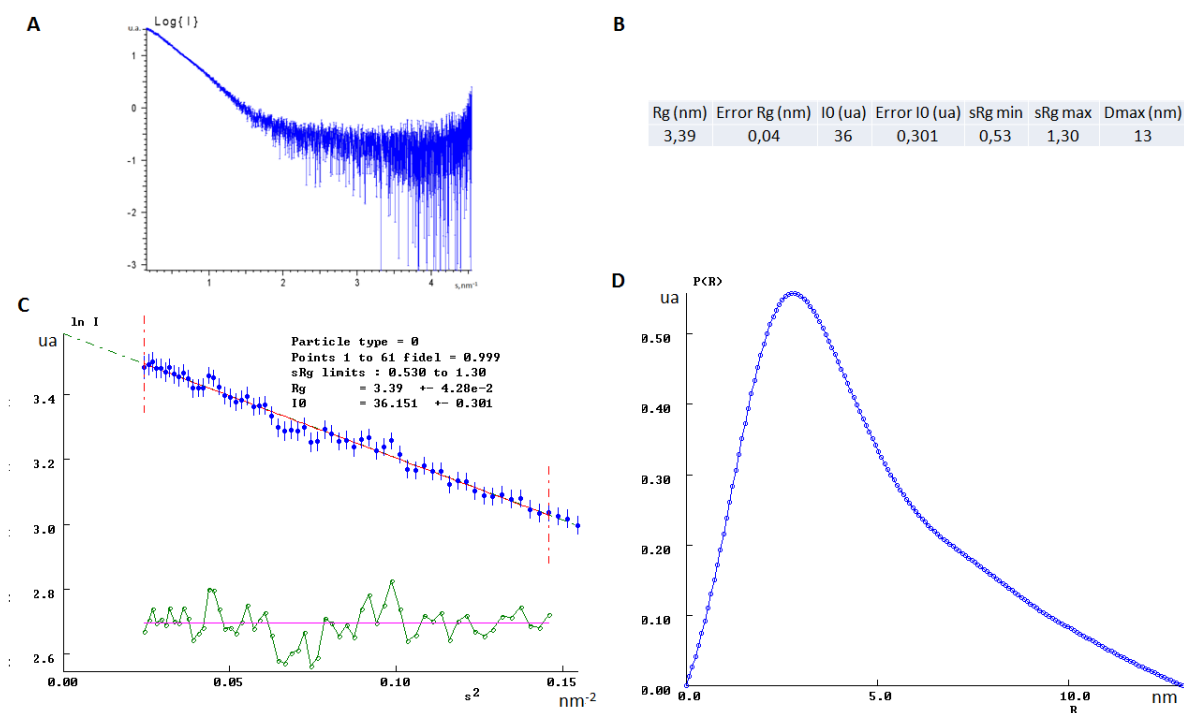


Figure 74 : Données enregistrées pour AMSH Fl. A) Données brutes : $\text{Log}(I)$ en fonction de s . B) Valeurs calculées à partir des données brutes d'AMSH Fl. C) Evaluation de la région de Guinier et calcul de R_g et D_{max} . D) Fonction de distribution des distances $P(r)$. R_g : rayon de giration, I : intensité, s : vecteur de diffusion, D_{max} : diamètre maximum d'AMSH en solution, ua : unités arbitraires. Analyse des données : Jens Radzimanowski.

Les logiciels DAMMIN et DAMMIF ont été utilisés pour simuler 10 modèles d'enveloppe correspondant aux données mesurées pour AMSH en solution. Les enveloppes moyennes obtenues grâce au logiciel DAMAVER sont présentées dans la figure 75. Elles sont très similaires et représente une structure très allongée de respectivement 123 et 124,5 Å.

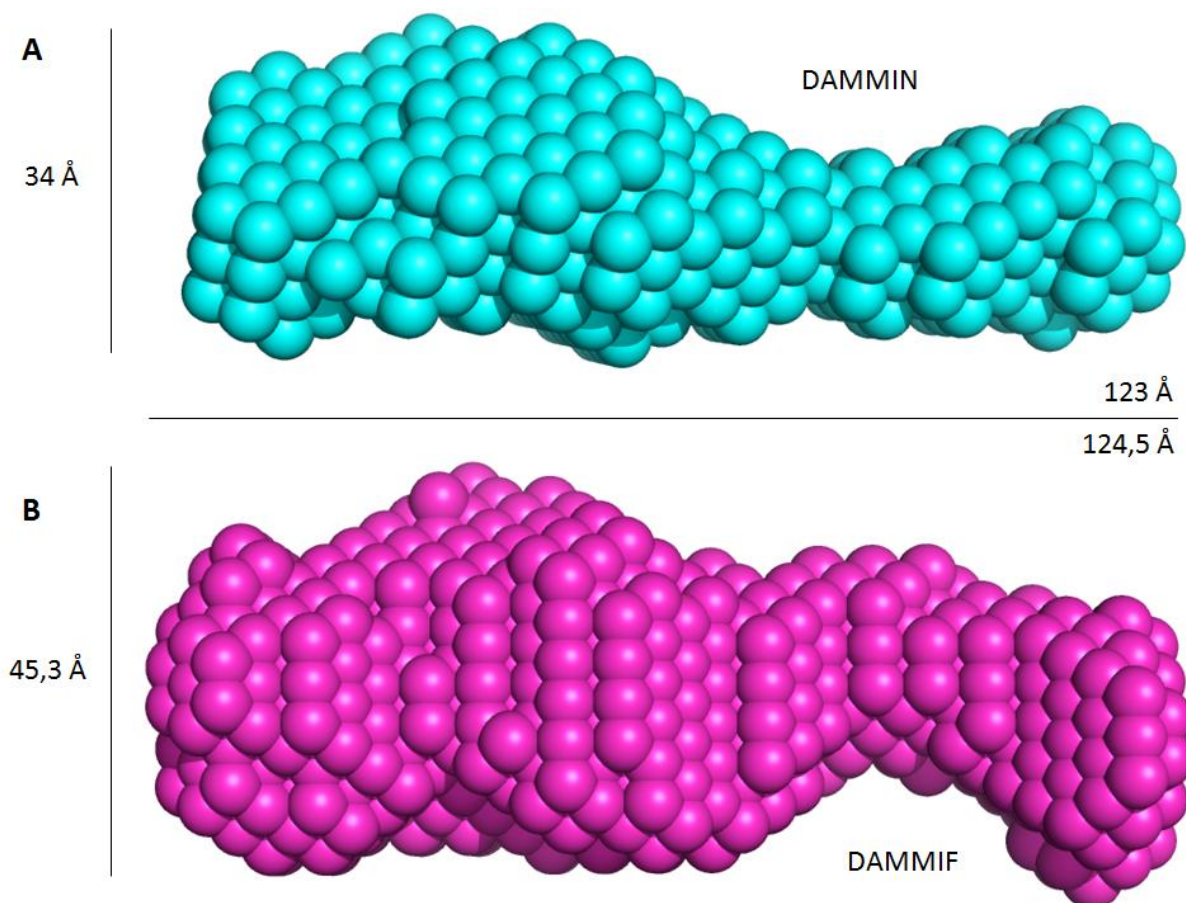


Figure 75 : Enveloppe moyenne de la structure d'AMSH en solution obtenue à partir des logiciels DAMMIN et DAMMIF. A) Moyenne de 10 modèles obtenus avec DAMMIN. B) Moyenne de 10 modèles obtenus avec DAMMIF.

Grâce au logiciel BUNCH, nous avons obtenu deux modélisations de l'organisation des domaines N-terminal et C-terminal. Le premier modèle, que nous appellerons Modèle A, a une structure globale très allongée : environ 112Å de long et 45Å de large et l'extrémité C-terminale de l'hélice $\alpha 5$ est proche du domaine JAMM (figure 76). Cette longueur est un peu plus petite que le Dmax calculé précédemment. Cependant, la valeur chi de ce modèle est de 0,77 ce qui indique que celui-ci est en accord avec les données expérimentales. Dans cette conformation, la boucle flexible est répartie tout autour de la structure et les résidus de l'hélice $\alpha 5$ de la partie N-terminale pourraient entrer en contact avec la partie C-terminale. De plus, d'après la superposition avec la structure du domaine JAMM en complexe avec la di-ubiquitine liée K63 (Davies et al., 2011), le site actif d'AMSH et la di-ubiquitine se situeraient à l'opposé du domaine N-terminal.

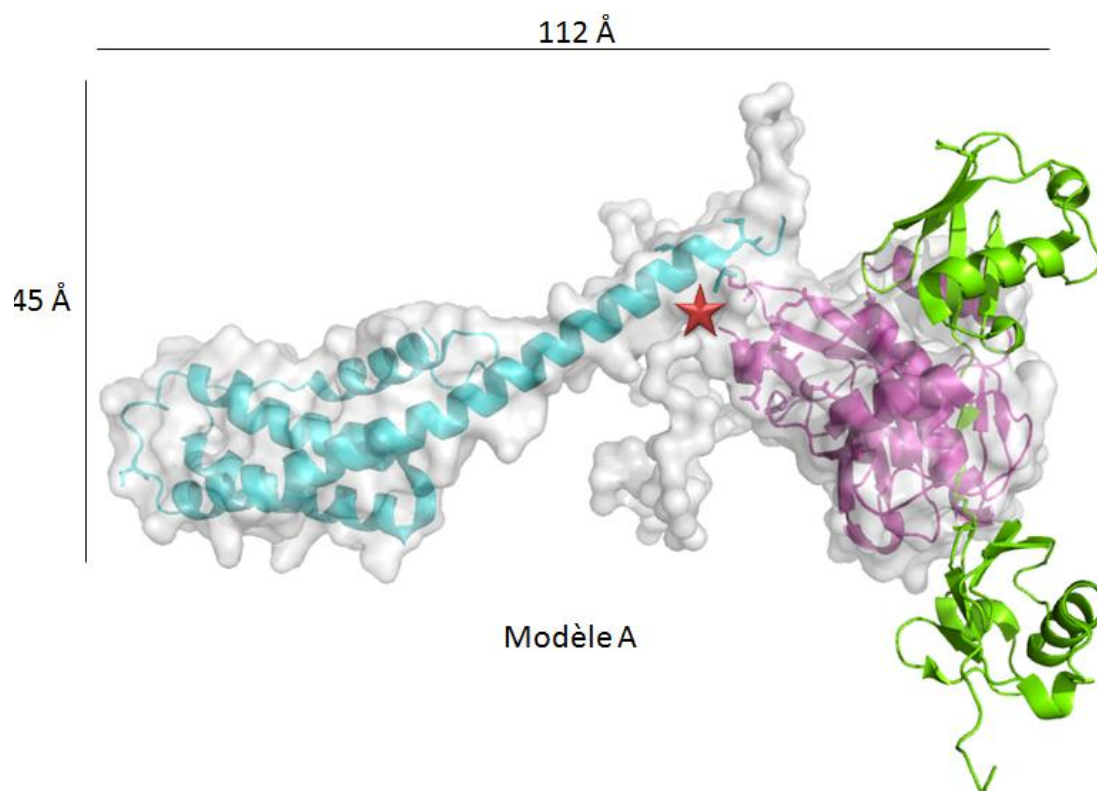


Figure 76 : Modèle A de la structure d'AMSH F1 seule obtenu par modélisation Ab initio des données de diffusion de rayons X aux petits angles. A) Structure globale. Bleu : Domaine MIT, Violet : Domaine catalytique, Vert : Di-ubiquitine liée par la lysine K63

Le deuxième modèle, le Modèle B est encore plus allongé que la modèle A : environ 124Å de long et 50 Å de largeur maximale, mais l'extrémité C-terminale de l'hélice $\alpha 5$ est la plus éloignée du domaine catalytique (figure 77). De plus, la boucle est beaucoup plus allongée, du fait qu'elle relie les deux domaines sur toute la longueur. Pour ce modèle la valeur chi est de 0,84 ce qui indique qu'il est aussi en accord avec les données expérimentales. Lorsque nous superposons la di-ubiquitine comme précédemment pour le Modèle A, il semblerait qu'elle entre en contact avec le domaine N-terminal. Pour que l'enzyme puisse être active, il faudrait donc que ce domaine se déplace ou que la di-ubiquitine ait une position différente de celle observée dans un cristal.

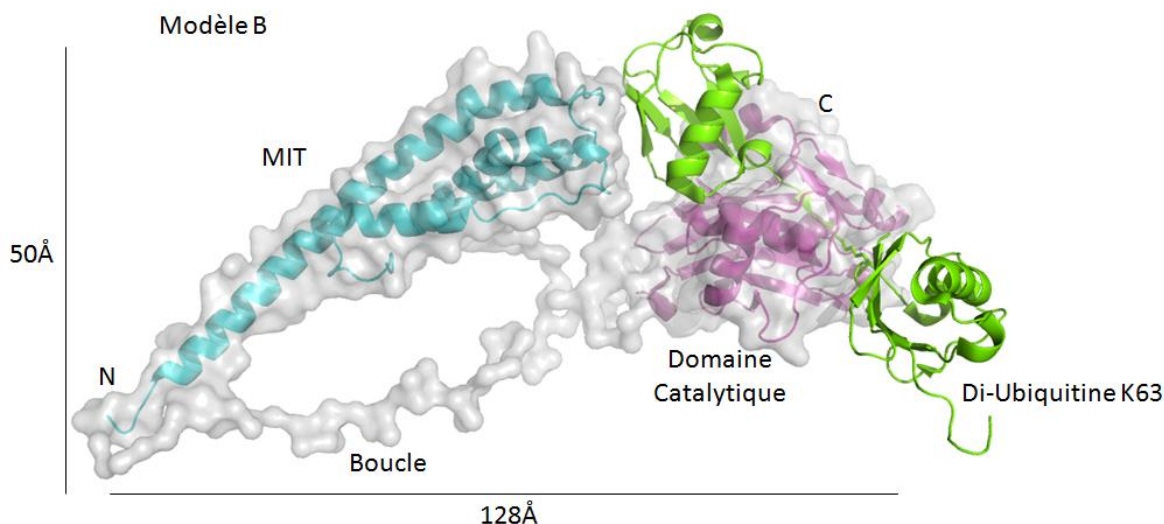


Figure 77 : Modèle B de la structure d'AMSH FI seule obtenu par modélisation Ab initio des données de diffusion de rayons X aux petits angles. Bleu : Domaine MIT, Violet : Domaine catalytique, Vert : Di-ubiquitine liée par la lysine K63.

Pour conclure, ces deux modèles ainsi que l'enveloppe à basse résolution obtenus grâce aux données de SAXS, montrent qu'AMSH adopte une conformation très allongée en solution. Il est cependant difficile de déterminer avec précision l'orientation du domaine N-terminal par rapport au domaine C-terminal car deux possibilités correspondent aux données expérimentales. La pertinence de ces deux modèles sera discutée dans la partie discussion.

AMSH/CHMP3 FI et AMSH/STAM V.U.S.

Le complexe AMSH FI/ CHMP3 FI a été purifié comme précédemment et AMSH FI et STAM VUS ont été purifiés séparément puis mélangés avec un rapport molaire de 1:1 ou 1:3. Des données ont été enregistrées pour chaque complexe et leur analyse est actuellement en cours. En ce qui concerne les résultats préliminaires du complexe CHMP3/AMSH FI, ils indiquent qu'il n'y a pas de changements significatifs pour le Rg (4,2nm) ni pour le Dmax (14,9 nm) de ce complexe par rapport à AMSH FI seule. La structure du complexe serait juste un peu plus allongée. Ceci pourrait indiquer qu'en se liant à AMSH, CHMP3 adopte aussi une structure très allongée ce qui ne modifierait pas significativement l'enveloppe à basse résolution. Les résultats préliminaires du complexe STAM VUS/ AMSH sont plus variables. En effet, quand les deux protéines sont analysées avec un excès molaire de STAM VUS de 1 :3, le Rg et le Dmax calculés sont respectivement de 4,3 nm et 15,2 nm ce qui n'est pas très différent de ce que nous observons pour AMSH seule. Cependant, quand les mesures de SAXS de ce complexe sont enregistrées avec un rapport molaire de 1 :1, alors le Rg et le Dmax calculés varient en fonction de la concentration de l'échantillon et oscillent entre 4,2 à 5,8 nm et 14,8 à 20,4 nm respectivement. Cela pourrait indiquer une agrégation de cet échantillon à plus haute concentration, mais des analyses supplémentaires seront nécessaires.

Discussion et perspectives

I. Interaction d'AMSH et UBPY avec les protéines CHMP

I.1 AMSH et CHMP3

L'interaction entre AMSH et CHMP3 a été décrite de nombreuses fois dans la littérature aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (McCullough et al., 2006) (Agromayor and Martin-Serrano, 2006) (Kyuuma et al., 2006) (Row et al., 2007) (Ma et al., 2007) (Lata et al., 2008a). Cette interaction, établie entre le domaine MIT d'AMSH et le domaine MIM de CHMP3, est nécessaire pour l'activité enzymatique d'AMSH *in vivo* mais pas *in vitro* et n'est pas indispensable pour la localisation d'AMSH aux endosomes (Kyuuma et al., 2006) (Ma et al., 2007). Malgré toutes les études portant sur ce complexe, aucune n'avait encore décrit le type d'interactions mises en jeu ni les résidus impliqués. Julianna Solomons, grâce à la cristallisation des domaines MIT et MIM de ces deux protéines, a montré qu'il existait des ponts salins ainsi que des liaisons hydrogènes entre les résidus E72, K88, E104 et K107 d'AMSH et respectivement R221, E203, R216 et L220/T219/S222 de CHMP3. Cependant, il était nécessaire de confirmer que ces interactions étaient bien à l'origine du complexe *y compris en solution*. Pour cela nous avons introduit les mutations correspondantes dans la séquence d'AMSH, purifié chacune des constructions et réalisé des expériences de co-précipitation. Nous avons ainsi confirmé que la mutation de trois des résidus suspectés, à savoir K88, E104 et K107 d'AMSH, diminuait considérablement sa liaison à CHMP3 et qu'ils étaient donc impliqués dans cette interaction en solution. La construction contenant la mutation de l'acide glutamique 72 n'a pas pu être étudiée faute de solubilité.

Pour aller plus loin dans l'étude à l'échelle atomique du complexe AMSH/CHMP3, nous voulions co-cristalliser les deux protéines entières. Ainsi nous aurions pu analyser les potentielles modifications conformationnelles et leurs conséquences (relève de l'auto-inhibition de CHMP3 ?). A la dernière étape de purification, les deux protéines du complexe éluent de la colonne de filtration sur gel en un seul pic, ce qui confirme leur forte affinité. Cependant, malgré l'absence de contaminations révélée par les gels SDS-PAGE, une hétérogénéité persistait et c'est probablement ce qui empêché la cristallisation. De plus, nous avons montré sur gel natif qu'après 24h seulement l'hétérogénéité d'AMSH augmentait et le complexe n'était plus formé. Ces désagréments peuvent être dus à la grande flexibilité d'AMSH qui adopterait différentes conformations en solution ce qui entrainerait une instabilité du complexe. Pour limiter ce problème, il faudrait essayer de co-purifier AMSH BrFl, qui ne contient pas la boucle flexible, et CHMP3 Fl. Tout d'abord nous devons nous assurer que cette nouvelle construction interagit toujours avec CHMP3. Ceci pourrait être vérifié, entre autres, par des expériences de co-précipitation ou de mesure de résonance plasmonique de surface.

I.2 AMSH et CHMP1A/1B

Les interactions entre AMSH et CHMP1A ou CHMP1B ont été déterminées par des tests de double hybride chez la levure et des essais de co-précipitation (Tsang et al., 2006) (Agromayor and Martin-Serrano, 2006) (Row et al., 2007) mais aucune information concernant la force de ces interactions ou les résidus mis en jeu n'avait été publiée jusque là. Cependant, il existe dans la littérature des données sur d'autres interactions de domaine MIT avec les protéines CHMP1A et CHMP1B. En effet, l'AAA ATPase VPS4 a été cristallisée en complexe avec CHMP1A et la spastine, impliquée dans le processus de cytokinèse, a été co-cristallisée avec CHMP1B. Ces interactions ont des constantes d'affinité de l'ordre du micromolaire, respectivement 4,6 et 12 μM , et celle entre VPS4 et CHMP1B est un peu plus faible avec une constante d'affinité d'environ 30 μM (Stuchell-Brereton et al., 2007) (Yang et al., 2008). Dans tous les cas ces interactions restent bien plus faibles que celle formée entre AMSH et CHMP3, qui est de 63 nM, et leurs structures confirment que, malgré des domaines MIT très similaires, les interfaces de contact sont différentes (figure 78).

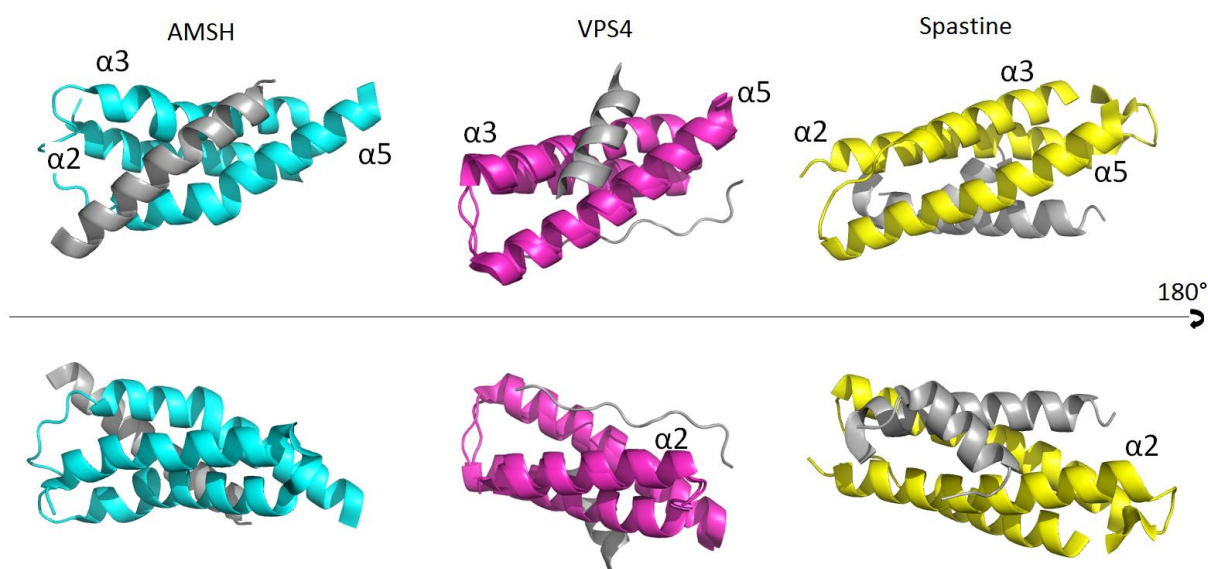


Figure 78 : Domaines MIT d'AMSH, de VPS4 et de la Spastine et leur interaction avec les protéines CHMP. Bleu : AMSH, Violet : VPS4, Jaune : Spastine, Gris : respectivement, CHMP3, CHMP1A (hélice) ou CHMP6 (non-structuré) et CHMP1B. Les domaines MIT ont été alignés selon $\alpha 5$. (Codes PDB : AMSH : 2XZE, VPS4 : 2JQ9 et 2KW3, Spastine : 3EAB, (Solomons et al., 2011) (Kieffer et al., 2008) (Yang et al., 2008) (Stuchell-Brereton et al., 2007))

Nous avons donc mesuré les constantes d'affinité des complexes AMSH/CHMP1A et AMSH/CHMP1B par mesure des résonances plasmoniques de surface, et analysé, par co-précipitation, si les résidus impliqués dans l'interaction avec CHMP3 étaient les mêmes pour AMSH/CHMP1B. Ces complexes ont des affinités proches, de 1,49 μM pour AMSH/CHMP1A et 1,16 μM pour AMSH/CHMP1B, et plus faibles que celle d'AMSH et CHMP3. Cependant, ces affinités restent plus élevées que toutes celles déterminées pour un

complexe avec une protéine CHMP1. Aussi, nous avons confirmé que les résidus K88 et E104 d'AMSH ne sont pas impliqués dans ces contacts, en effet, leur mutation n'a pas eu d'effet sur la co-précipitation de CHMP1A ou CHMP1B par AMSH. Nous pouvons donc confirmer qu'AMSH explore différents modes d'interaction avec ses partenaires. Pour déterminer si les domaines MIM de CHMP1A et/ou CHMP1B utilisent les mêmes interfaces avec AMSH qu'avec VPS4 ou la spastine nous avons tenté de co-cristalliser ces protéines mais sans succès. Une autre solution serait d'analyser la conservation, chez AMSH et VPS4 ou la spastine, des résidus impliqués dans les différents complexes puis, de muter dans la séquence d'AMSH les résidus conservés et de réaliser des tests de co-précipitation. Nous pourrions aussi tester si AMSH est capable de lier en même temps CHMP3 et CHMP1B. Si oui, l'interface de contact serait soit proche de celle de la spastine et CHMP1B ou de VPS4 et CHMP6 soit une nouvelle zone, si non, il se pourrait qu'AMSH lie CHMP1B de façon similaire à VPS4 et CHMP1A (figure 79).

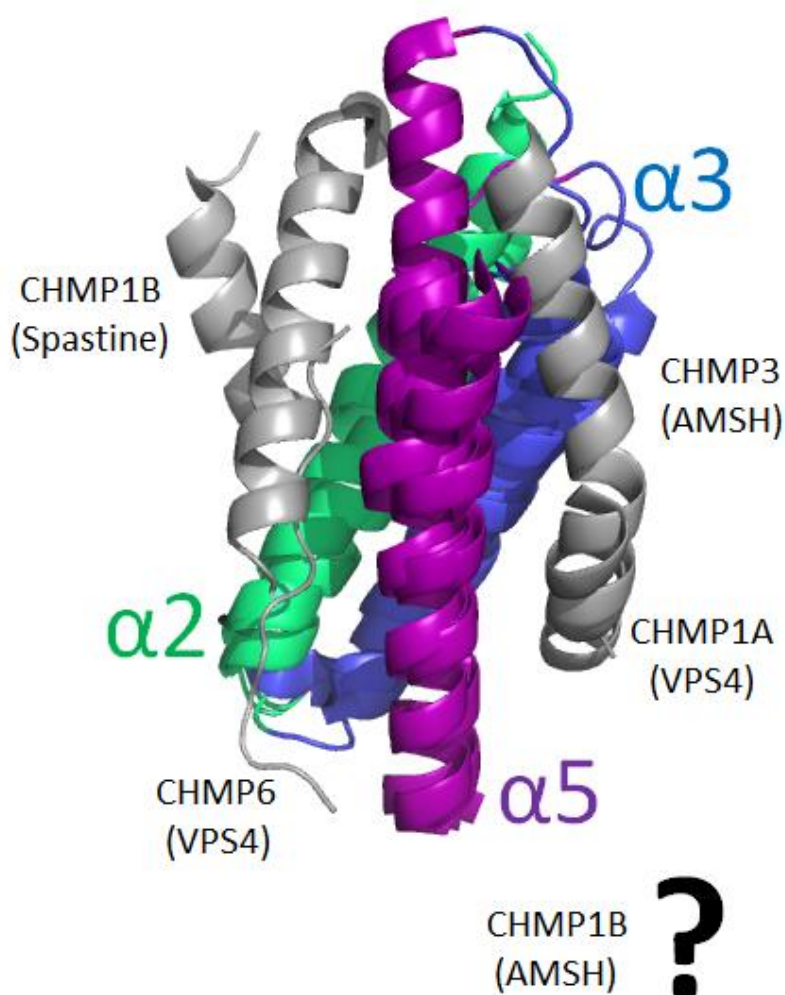


Figure 79 : Différents modes de liaisons entre domaine MIT et domaine MIM. Superposition des domaines MIT d'AMSH, de VPS4 et de la Spastine. Les hélices-alpha sont repérées en couleur : violet : $\alpha 5$, bleu : $\alpha 2$, vert : $\alpha 3$ (Codes PDB : AMSH/CHMP3 : 2XZE, VPS4/CHMP1A : 2JQ9, Spastine/CHMP1B : 3EAB, VPS4/ CHMP6 : 2K3W, (Solomons et al., 2011) (Kieffer et al., 2008) (Yang et al., 2008) (Stuchell-Brereton et al., 2007))

I.3 UBPY et CHMP1B

Les résultats concernant l'interaction d'UBPY N-ter avec CHMP1B C-ter sont mitigés. D'un côté cette interaction semble possible selon les résultats de filtration sur gel et les tests *in vivo* d'Anne-Claire Jacomin et de l'autre elle n'est pas retrouvée lors d'essais de co-précipitation ou de mesure des résonnances plasmoniques de surface. De plus, Row et al. observaient aussi cette interaction lors d'essais de co-précipitation et de test en double hybride chez la levure. Deux facteurs varient pour chaque protéine lors ces expériences : la longueur des protéines utilisées ainsi que l'étiquette à laquelle elles sont attachées. CHMP1B interagit avec UBPY *in vivo* peu importe sa longueur (entière ou C-ter) et avec une étiquette GST ou GFP qui sont toutes les deux de taille similaire. Ce n'est donc ni l'étiquette GST de CHMP1B, ni sa longueur qui empêche son interaction avec UBPY lors de nos tests *in vitro*. En ce qui concerne UBPY, Row et al. ont confirmé que la forme entière et la forme tronquée (1-133) de cette protéine attachées à une étiquette GST pouvaient toutes les deux co-précipiter CHMP1B entière. Cependant, lors de nos études nous avons travaillé avec la construction tronquée 8-138 d'UBPY attachée à une étiquette hexa-histidine. Cette construction a été cristallisée par Avvakumov et al. et sa structure est dimérique. L'existence de ce dimère en solution n'a cependant pas été analysée lors de cette étude. De plus, lors de nos purifications par filtration sur gel, il était difficile de distinguer avec certitude si l'élution de la protéine correspond à un monomère (15 kDa) ou un dimère (30 kDa) car ces deux formes éluaient à un volume trop proche. Il serait donc possible que la forme dimérique d'UBPY, pouvant être déstabilisée par l'étiquette GST, bloque la formation du complexe CHMP1B/UBPY. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions tout d'abord analyser la solution d'UBPY par chromatographie d'exclusion de taille couplée à une mesure de diffusion de la lumière laser à angles multiples (SEC-MALLS) afin de s'assurer de l'état oligomérique de notre protéine. Ensuite, si celle-ci est dimérique, nous pourrions recloner le gène d'UBPY afin d'y ajouter une étiquette GST et de reproduire les essais d'interaction. Cependant, s'il s'avère que c'est en effet la forme monomérique d'UBPY, maintenue dans cet état par l'étiquette GST, qui interagit avec CHMP1B et si nous voulons caractériser ce complexe par cristallographie, il faudra peut être s'affranchir de cette étiquette volumineuse et muter les résidus d'UBPY à l'interface de dimérisation pour obtenir uniquement notre protéine monomérique en solution.

Pour conclure, nos recherches sur les complexes entre les dé-ubiquitinases AMSH et UBPY et les protéines CHMP ont permis de confirmer que les résidus et les interactions mis en jeu diffèrent d'un complexe à l'autre et que cela a des conséquences sur la force de l'interaction. La poursuite de ces recherches permettrait d'identifier les résidus importants pour l'interaction entre les protéines CHMP1 et les DUB et de mieux comprendre leur recrutement, leur fonctionnement et leur régulation au sein des processus cellulaires.

II. Interaction d'AMSH avec STAM2 et ses conséquences sur l'activité enzymatique d'AMSH

II.1 Interaction entre AMSH et les domaines VHS, UIM et SH3 de STAM

L'interaction entre STAM et AMSH est à l'origine de la découverte d'AMSH (Tanaka et al., 1999). Ce n'est que sept ans plus tard, en 2006, que le rôle de STAM dans l'activation de l'activité enzymatique d'AMSH a été proposé (McCullough et al., 2006) (Kim et al., 2006). Des essais de co-immunoprécipitation et des mesures de polarisation de fluorescence ont montré que cette interaction est dépendante d'un motif RXXK situé dans la partie centrale d'AMSH. De plus, des mesures par ITC ont permis de calculer les constantes d'affinité entre différentes constructions d'AMSH et de STAM1 ou STAM2 (Tanaka et al., 1999) (Kim et al., 2006) (tableau 5). Cependant, ces études intègrent dans leur mesure uniquement le domaine SH3 de STAM et/ou qu'une forme tronquée d'AMSH, nous avons donc voulu étendre les connaissances sur cette interaction à la protéine AMSH entière et aux trois domaines N-terminaux de STAM capables de lier l'ubiquitine : VHS, UIM et SH3 (Lange et al., 2012b). Pour cela, nous avons mesuré les résonances plasmoniques de surface lors de l'interaction entre AMSH Fl et STAM UIM-SH3 ou STAM VUS. Dans le premier cas la constante d'affinité calculée est de 260 μM ce qui est plus de 40 fois plus faible que celle calculée pour la partie C-terminale d'AMSH (219-424) et le domaine SH3 de STAM. Ceci peut s'expliquer par deux phénomènes : soit le domaine N-terminal d'AMSH, qui n'était pas présent lors des précédentes expériences, empêche l'accès de STAM UIM-SH3 à son site de liaison, soit le domaine UIM de STAM n'interagit pas avec AMSH et diminue l'affinité de UIM-SH3 pour notre enzyme. Les résultats de l'activation de l'activité enzymatique d'AMSH par STAM, nous ont montré qu'UIM-SH3 était capable d'activer AMSH et que la partie N-terminale ne bloquait probablement pas l'interaction entre ces deux protéines. Alors, le domaine UIM n'est pas impliqué dans l'interaction avec AMSH.

Pour le deuxième complexe, entre AMSH Fl et STAM VUS, l'affinité mesurée est cette fois-ci presque 40 fois plus forte que celle entre AMSH (219-424) et le domaine SH3 de STAM. Cette valeur n'est pas en adéquation avec les résultats des essais de co-purification par filtration sur gel ou de migration sur gel natif. En effet, un complexe ayant une telle force d'affinité devrait éluer en un seul pic lors d'une filtration sur gel et ne pas se dissocier sur un gel natif or, ce n'est pas le cas. Lors des mesures de SPR nous avons constaté qu'il était difficile de régénérer la surface et d'éliminer totalement le complexe formé entre AMSH et STAM VUS. Cette persistance d'une petite partie du complexe a pu augmenter significativement la constante de dissociation et ainsi influencer à la hausse la constante d'affinité qui est égale à k_d/k_a .

Pour conclure, ces résultats semblent confirmer que STAM est capable de lier AMSH uniquement grâce à son domaine SH3. Les autres domaines, liant l'ubiquitine, pourraient alors avoir uniquement un rôle de présentation de la molécule à l'enzyme.

Technique utilisée	AMSH	STAM	Affinité (μM)	Référence
ITC	230-241	SH3	7,23	Kim et al., 2006
ITC	219-424	SH3	6	Kim et al., 2006
Polarisation de fluorescence	230-240	STAM1 SH3	11	Sierra et al., 2010
Polarisation de fluorescence	230-240	STAM2 SH3	4,8	Sierra et al., 2010
SPR	1-424	STAM2 UIM-SH3	260	Données personnelles
SPR	1-424	STAM2 VHS-UIM-SH3	0,160	Données personnelles

Tableau 5 : Valeur des constantes d'affinité calculées pour différentes constructions d'AMSH et de STAM.

II.2 L'activité enzymatique d'AMSH est activée par STAM

En ce qui concerne l'activité enzymatique d'AMSH, plusieurs études ont montré sa spécificité envers les chaînes d'ubiquitine liées par leur lysine K63 et certaines ont aussi analysé son activation par STAM (McCullough et al., 2004) (McCullough et al., 2006) (Kim et al., 2006). Ces expériences ont été réalisées avec AMSH seule ou AMSH en complexe avec STAM pour des temps de réaction fixes. Alors, après deux heures d'incubation, AMSH est capable d'hydrolyser des chaînes de tétra ou di-ubiquitine et 15 minutes suffisent lorsque l'enzyme est en présence de son activateur. Cependant, aucune étude n'a été publiée concernant la cinétique de l'activité enzymatique d'AMSH ou des temps de réaction beaucoup plus courts. Les tests que nous avons mis en place permettent d'évaluer l'action d'AMSH dès 30 secondes et montrent que l'enzyme seule est très peu active dans un laps de temps compatible avec les processus cellulaires dans lesquels elle est impliquée. En effet, même après 30 minutes, AMSH n'a pas hydrolysé la moitié de la quantité de di-ubiquitine présente. L'ajout de STAM UIM-SH3 ou VUS permet d'accélérer ce procédé et les deux constructions ont un effet équivalent. Grâce à la mesure d'apparition de fluorescence, qui est plus sensible, la dégradation de la di-ubiquitine est visible dès l'ajout de l'activateur et, pour les deux expériences, la moitié de la di-ubiquitine disponible est hydrolysée dès 5 minutes de réaction. Il est donc possible qu'*in vivo* AMSH subisse une auto-inhibition et que celle-ci soit levée par l'interaction avec STAM. Cependant, le domaine VHS n'intervient pas dans cette activation.

Ces résultats accentuent l'hésitation que nous avons concernant la justesse de la constante d'affinité mesurée entre AMSH Fl et STAM VUS et il serait judicieux de vérifier cette valeur par une autre technique comme la titration de calorimétrie isothermique (ITC). De plus, afin

de compléter cette analyse, nous pourrions appliquer nos tests de dé-ubiquitination au complexe AMSH/ STAM SH3 afin de déterminer si le domaine SH3 agit seul dans l'activation d'AMSH ou si UIM est indispensable.

III. Analyse structurale d'AMSH

Le but premier de ce travail de thèse portait sur l'analyse structurale d'AMSH Fl afin de mieux comprendre sa régulation et son implication dans la régulation des protéines ESCRT. En effet, les conséquences d'une délétion, d'une inactivation ou d'une surexpression d'AMSH présentées dans la littérature sont très contradictoires. Ainsi, en ce qui concerne la dégradation du récepteur au facteur de croissance épithélial (EGFR), McCullough et al. ont montré en 2004 qu'une délétion par siRNA d'AMSH entraînait une augmentation de la dégradation de l'EGFR. A l'inverse, Ma et al. ont observé une diminution de la dégradation d'EGFR lorsqu'AMSH ne peut plus être recrutée à la membrane en raison de la surexpression d'une forme tronquée de CHMP3. Cependant, cet effet pourrait aussi être directement lié à cette modification de l'expression de CHMP3 sauvage. La même incohérence est présente lors de l'analyse du niveau de protéines ubiquitinées lorsqu'AMSH est délétée. Row et al. (2006) n'ont observé aucun effet de cette délétion dans des cellules HeLa alors que Suzuki et al. (2011) remarquent une augmentation des protéines ubiquitinées dans la fraction membranaire du cerveau. AMSH, qui est présente dans tous les tissus humains testés à ce jour (Tanaka et al., 1999), pourrait donc agir de façon spécifique dans différents types cellulaires. Malgré tout, les différents groupes travaillant sur la fonction et le rôle d'AMSH au sein de la cellule semblent s'accorder sur un point : STAM serait un des substrats d'AMSH. En effet, Row et al. (2006) et Sierra et al. (2011) ont montré que lorsqu'AMSH est délétée, le niveau de STAM ubiquitinée augmente. Cependant, contrairement à l'action d'UBPY cette dé-ubiquitination n'influencerait pas la dégradation de STAM par le protéasome. AMSH hydrolyserait donc une ubiquitine de STAM impliquée dans d'autres fonctions que sa stabilité (Sierra et al., 2010). De plus, lorsque la partie N-terminale d'AMSH est déstabilisée et qu'AMSH et co-exprimée avec CHMP3, cela exerce une forte inhibition du bourgeonnement viral, alors qu'AMSH seule ou AMSH co-exprimée avec CHMP3 sans déstabilisation de sa partie N-terminale n'a aucun effet (Zamborlini et al., 2006) (Agromayor and Martin-Serrano, 2006) (Solomons et al., 2011). Toutes ces informations semblent indiquer qu'AMSH pourrait avoir un rôle de régulateur des protéines du système ESCRT et notamment STAM et CHMP3. C'est pourquoi nous avons étudié les caractéristiques structurales d'AMSH Fl seule ou en complexe avec CHMP3 ou STAM.

Malgré de nombreux essais et malgré l'utilisation de formes tronquées ou mutées d'AMSH Fl nous n'avons pu cristalliser cette protéine. Ceci est probablement dû à la flexibilité apportée par la boucle centrale d'AMSH prédite non structurée par GlobPlot. De plus, bien que les profils de filtration sur gel correspondent à ceux d'un échantillon homogène, la polydispersité n'est jamais descendue en dessous de 20% et une certaine hétérogénéité était observée sur gel natif.

Cependant nous avons pu analyser cette protéine en solution, à plus faible concentration, grâce à la diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS). Cette technique nous a permis d'obtenir une enveloppe globale de la protéine et, grâce aux structures cristallographiques pré-existantes d'établir deux modèles de l'organisation des domaines N-terminal et C-terminal d'AMSH en solution. Ces données montrent que notre enzyme est très allongée, entre 110 Å et 124 Å. Les deux modèles obtenus varient sur la position de la partie N-terminale d'AMSH par rapport à la partie C-terminale. Dans le modèle A l'extrémité C-terminale de l'hélice $\alpha 5$ est proche du domaine JAMM, alors qu'elle est à son opposé dans le modèle B. La valeur de D_{max} obtenue grâce au calcul de la fonction $P(r)$ est de 130 Å et ceci correspondrait à la longueur obtenue pour le modèle B. Alors, le domaine central non structuré d'AMSH se positionnerait le long de la protéine pour relier les deux domaines structurés (figure 80).

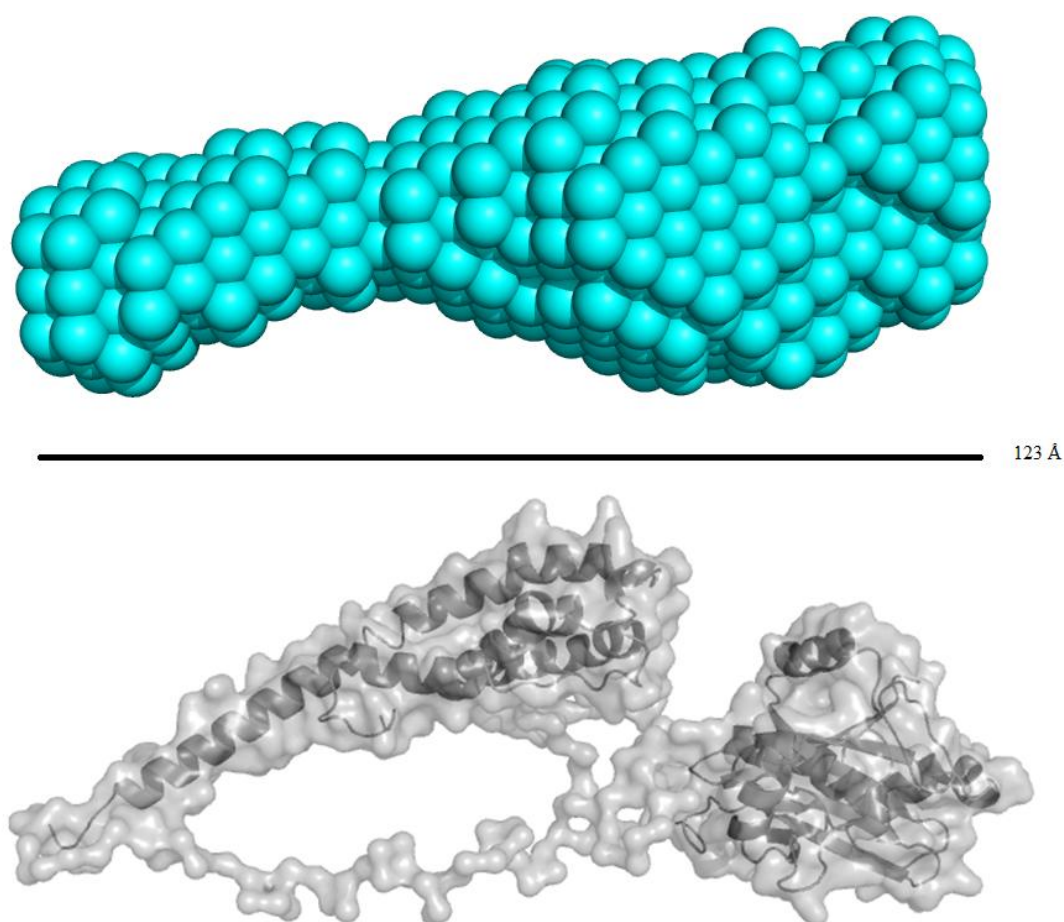
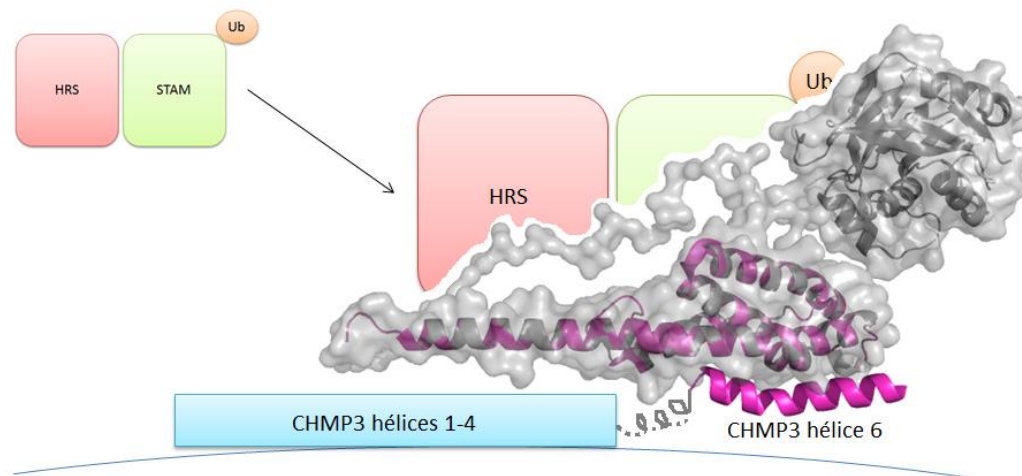


Figure 80 : Modélisation de l'enveloppe d'AMSH en solution et de l'organisation des domaines N et C-terminaux. Haut : enveloppe moyenne obtenue par modélisation ab initio avec les logiciels DAMMIN et DAMAVER. Bas : Modélisation grâce au logiciel BUNCH des domaines N et C-terminaux d'AMSH, Modèle B.

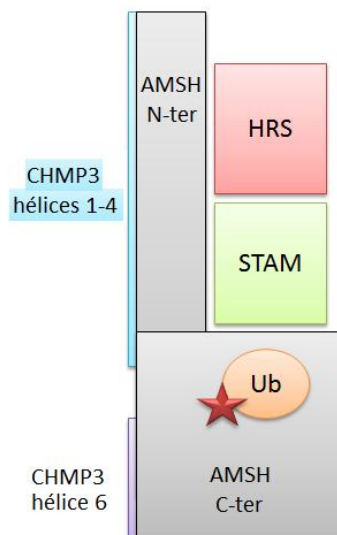
Afin d'améliorer nos connaissances sur cette structure nous pourrions essayer de cristalliser ou d'analyser en SAXS la forme plus courte de l'homologue d'AMSH chez *Branchiostoma floridae* présentée dans la partie résultats. En effet, dans le même esprit nous avons cloné et purifié AMSH link5 mais cette construction était trop hétérogène en solution. Ce problème

pourrait être résolu par le fait qu'AMSH BrFl existe à l'état naturel et comporte peut être des éléments de stabilisation que nous n'avons pas dans AMSH link5.

Nous voulions aussi étudier les changements conformationnels ayant lieu lorsqu'AMSH entre en contact avec ses partenaires CHMP3 et STAM. Pour cela nous avons aussi enregistré des données de SAXS pour les complexes AMSH/CHMP3 ou AMSH/STAM (1 :1) en solution. Les résultats préliminaires montrent que pour ces deux complexes le Dmax ne varie pas significativement. Pour AMSH/STAM VUS, cela pourrait s'expliquer par le fait que complexe ne résiste pas à la filtration sur gel et que nous avons du mélanger après purification ces deux protéines et que nous ne sommes donc pas sûrs de la quantité de protéine libre ou en complexe. Ainsi, si l'interaction entre les deux protéines est très faible ou très brève, il se peut que la majorité d'AMSH soit seule en solution et que le signal de cette molécule soit celui que nous enregistrons. En ce qui concerne AMSH/CHMP3, il se pourrait que la structure de CHMP3 s'allonge pour être corrélée à la structure très allongée et très fine d'AMSH et qu'un réarrangement de CHMP3 ait lieu sous l'influence d'AMSH. Dans ce contexte, CHMP3 positionnerait AMSH afin qu'elle puisse hydrolyser les ubiquitines orientées par STAM (figure 81).



Vue de profil



Vue de dessus

Figure 81 : Hypothèse de fonctionnement du complexe tri-partite AMSH/ STAM/ CHMP3. Haut vue de profil, Bas : vue de dessus. STAM et CHMP3 permettraient le positionnement d'AMSH à la membrane afin d'hydrolyser les liaisons isopeptidiques des chaînes de polyubiquitine ou de mono-ubiquitine attachées sur STAM.

Références

A

- Agromayor, M., and Martin-Serrano, J. (2006). Interaction of AMSH with ESCRT-III and Deubiquitination of Endosomal Cargo. *J. Biol. Chem.* 281, 23083–23091.
- Agromayor, M., Carlton, J.G., Phelan, J.P., Matthews, D.R., Carlin, L.M., Ameer-Beg, S., Bowers, K., and Martin-Serrano, J. (2009). Essential Role of hIST1 in Cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 20, 1374–1387.
- Alam, S.L., Langelier, C., Whitby, F.G., Koirala, S., Robinson, H., Hill, C.P., and Sundquist, W.I. (2006). Structural basis for ubiquitin recognition by the human ESCRT-II EAP45 GLUE domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1029–1030.
- Alwan, H.A.J., and van Leeuwen, J.E.M. (2007). UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation. *J. Biol. Chem.* 282, 1658–1669.
- Avvakumov, G.V., Walker, J.R., Xue, S., Finerty, P.J., Mackenzie, F., Newman, E.M., and Dhe-Paganon, S. (2006). Amino-terminal Dimerization, NRDP1-Rhodanese Interaction, and Inhibited Catalytic Domain Conformation of the Ubiquitin-specific Protease 8 (USP8). *J. Biol. Chem.* 281, 38061–38070.
- Azmi, I., Davies, B., Dimaano, C., Payne, J., Eckert, D., Babst, M., and Katzmann, D.J. (2006). Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1. *J. Cell Biol.* 172, 705–717.

B

- Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B., and Emr, S.D. (2002a). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev. Cell* 3, 283–289.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T., and Emr, S.D. (2002b). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev. Cell* 3, 271–282.
- Bajorek, M., Morita, E., Skalicky, J.J., Morham, S.G., Babst, M., and Sundquist, W.I. (2009a). Biochemical analyses of human IST1 and its function in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 20, 1360–1373.
- Bajorek, M., Schubert, H.L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D.M., Stubblefield, W.-M.B., Uter, N.T., Myszka, D.G., Hill, C.P., and Sundquist, W.I. (2009b). Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 754–762.
- Barr, F.A., and Gruneberg, U. (2007). Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell* 131, 847–860.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.
- Berlin, I., Schwartz, H., and Nash, P.D. (2010). Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Ubiquitination and Trafficking by the USP8?STAM Complex. *J. Biol. Chem.* 285, 34909–34921.
- Berry, D.M., Nash, P., Liu, S.K.-W., Pawson, T., and McGlade, C.J. (2002). A high-affinity Arg-X-X-Lys SH3 binding motif confers specificity for the interaction between Gads and SLP-76 in T cell signaling. *Curr. Biol. CB* 12, 1336–1341.

Bodon, G., Chassefeyre, R., Pernet-Gallay, K., Martinelli, N., Effantin, G., Hulsik, D.L., Belly, A., Goldberg, Y., Chatellard-Causse, C., Blot, B., et al. (2011). Charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) of the endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 286, 40276–40286.

Boura, E., Rózycki, B., Herrick, D.Z., Chung, H.S., Vecer, J., Eaton, W.A., Cafiso, D.S., Hummer, G., and Hurley, J.H. (2011). Solution structure of the ESCRT-I complex by small-angle X-ray scattering, EPR, and FRET spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9437–9442.

Briggs, J.A.G., Riches, J.D., Glass, B., Bartonova, V., Zanetti, G., and Kräusslich, H.-G. (2009). Structure and assembly of immature HIV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11090–11095.

C

Carlton, J.G., and Martin-Serrano, J. (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316, 1908–1912.

Chen, Y.-S., and Qiu, X.-B. (2013). Ubiquitin at the crossroad of cell death and survival. *Chin. J. Cancer.*

Chu, T., Sun, J., Saksena, S., and Emr, S.D. (2006). New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J. Cell Biol.* 175, 815–823.

Chung, H.-Y., Morita, E., von Schwedler, U., Müller, B., Kräusslich, H.-G., and Sundquist, W.I. (2008). NEDD4L overexpression rescues the release and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 constructs lacking PTAP and YPYL late domains. *J. Virol.* 82, 4884–4897.

Clague, M.J., Coulson, J.M., and Urbé, S. (2012). Cellular functions of the DUBs. *J. Cell Sci.* 125, 277–286.

Costa, M. do C., and Paulson, H.L. (2012). Toward understanding Machado-Joseph disease. *Prog. Neurobiol.* 97, 239–257.

Curtiss, M., Jones, C., and Babst, M. (2007). Efficient cargo sorting by ESCRT-I and the subsequent release of ESCRT-I from multivesicular bodies requires the subunit Mvb12. *Mol. Biol. Cell* 18, 636–645.

D

Davies, C.W., Paul, L.N., Kim, M.-I., and Das, C. (2011). Structural and Thermodynamic Comparison of the Catalytic Domain of AMSH and AMSH-LP: Nearly Identical Fold but Different Stability. *J. Mol. Biol.* 413, 416–429.

Debonneville, C., and Staub, O. (2004). Participation of the ubiquitin-conjugating enzyme UBE2E3 in Nedd4-2-dependent regulation of the epithelial Na⁺ channel. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2397–2409.

Dimaano, C., Jones, C.B., Hanono, A., Curtiss, M., and Babst, M. (2008). Ist1 regulates Vps4 localization and assembly. *Mol. Biol. Cell* 19, 465–474.

Dolnik, O., Kolesnikova, L., and Becker, S. (2008). Filoviruses: Interactions with the host cell. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 756–776.

Dong, K.C., Helgason, E., Yu, C., Phu, L., Arnott, D.P., Bosanac, I., Compaa, D.M., Huang, O.W., Fedorova, A.V., Kirkpatrick, D.S., et al. (2011). Preparation of distinct ubiquitin chain reagents of high purity and yield. *Struct. Lond. Engl.* 1993 19, 1053–1063.

Dordor, A., Poudevigne, E., Göttlinger, H., and Weissenhorn, W. (2011). Essential and supporting host cell factors for HIV-1 budding. *Future Microbiol.* 6, 1159–1170.

E

Effantin, G., Dordor, A., Sandrin, V., Martinelli, N., Sundquist, W.I., Schoehn, G., and Weissenhorn, W. (2013a). ESCRT-III CHMP2A and CHMP3 form variable helical polymers in vitro and act synergistically during HIV-1 budding. *Cell. Microbiol.* 15, 213–226.

Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T.A., Hurley, J.H., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4846–4851.

F

Fabrikant, G., Lata, S., Riches, J.D., Briggs, J.A.G., Weissenhorn, W., and Kozlov, M.M. (2009). Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000575.

Finzi, A., Orthwein, A., Mercier, J., and Cohen, E.A. (2007). Productive human immunodeficiency virus type 1 assembly takes place at the plasma membrane. *J. Virol.* 81, 7476–7490.

Di Fiore, P.P., Polo, S., and Hofmann, K. (2003). Opinion: When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 491–497.

Fotia, A.B., Dinudom, A., Shearwin, K.E., Koch, J.-P., Korbmacher, C., Cook, D.I., and Kumar, S. (2003). The role of individual Nedd4-2 (KIAA0439) WW domains in binding and regulating epithelial sodium channels. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 70–72.

Fyfe, I., Schuh, A.L., Edwardson, J.M., and Audhya, A. (2011). Association of the endosomal sorting complex ESCRT-II with the Vps20 subunit of ESCRT-III generates a curvature-sensitive complex capable of nucleating ESCRT-III filaments. *J. Biol. Chem.* 286, 34262–34270.

G

Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Côté, M., Rich, R.L., et al. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55–65.

Ghazi-Tabatabai, S., Saksena, S., Short, J.M., Pobbati, A.V., Veprintsev, D.B., Crowther, R.A., Emr, S.D., Egelman, E.H., and Williams, R.L. (2008). Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Struct. Lond. Engl.* 1993 16, 1345–1356.

Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., and De Wilde, M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59, 103–112.

Gill, D.J., Teo, H., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D.B., Emr, S.D., and Williams, R.L. (2007). Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J.* 26, 600–612.

Gorden, P., Carpentier, J.L., Cohen, S., and Orci, L. (1978). Epidermal growth factor: morphological demonstration of binding, internalization, and lysosomal association in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 5025–5029.

Gottlinger, H.G., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5781–5785.

Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 317–323.

Guizetti, J., and Gerlich, D.W. (2010). Cytokinetic abscission in animal cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 909–916.

Guizetti, J., and Gerlich, D.W. (2012). ESCRT-III polymers in membrane neck constriction. *Trends Cell Biol.* 22, 133–140.

Guizetti, J., Schermelleh, L., Mäntler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H., Müller-Reichert, T., and Gerlich, D.W. (2011). Cortical Constriction During Abscission Involves Helices of ESCRT-III–Dependent Filaments. *Science* 331, 1616–1620.

H

Haigler, H.T., McKanna, J.A., and Cohen, S. (1979). Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *J. Cell Biol.* 81, 382–395.

Hamasaki, M., Shibutani, S.T., and Yoshimori, T. (2013). Up-to-date membrane biogenesis in the autophagosome formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 455–460.

Hanson, P.I., Roth, R., Lin, Y., and Heuser, J.E. (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* 180, 389–402.

Hanyaloglu, A.C., McCullagh, E., and von Zastrow, M. (2005). Essential role of Hrs in a recycling mechanism mediating functional resensitization of cell signaling. *EMBO J.* 24, 2265–2283.

Hartlieb, B., and Weissenhorn, W. (2006). Filovirus assembly and budding. *Virology* 344, 64–70.

Hasdemir, B., Murphy, J.E., Cottrell, G.S., and Bunnnett, N.W. (2009). Endosomal deubiquitinating enzymes control ubiquitination and down-regulation of protease-activated receptor 2. *J. Biol. Chem.* 284, 28453–28466.

Henne, W.M., Buchkovich, N.J., and Emr, S.D. (2011). The ESCRT pathway. *Dev. Cell* 21, 77–91.

Hierro, A., Sun, J., Rusnak, A.S., Kim, J., Prag, G., Emr, S.D., and Hurley, J.H. (2004). Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature* 431, 221–225.

Hirano, S., Suzuki, N., Slagsvold, T., Kawasaki, M., Trambaiolo, D., Kato, R., Stenmark, H., and Wakatsuki, S. (2006). Structural basis of ubiquitin recognition by mammalian Eap45 GLUE domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1031–1032.

Hislop, J.N., Henry, A.G., Marchese, A., and von Zastrow, M. (2009). Ubiquitination regulates proteolytic processing of G protein-coupled receptors after their sorting to lysosomes. *J. Biol. Chem.* 284, 19361–19370.

Hofmann, K., and Falquet, L. (2001). A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 347–350.

Hu, M., Li, P., Li, M., Li, W., Yao, T., Wu, J.-W., Gu, W., Cohen, R.E., and Shi, Y. (2002). Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell* *111*, 1041–1054.

Hunter, T. (2007). The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol. Cell* *28*, 730–738.

Hurley, J.H., and Hanson, P.I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 556–566.

Hurley, J.H., and Stenmark, H. (2011). Molecular Mechanisms of Ubiquitin-Dependent Membrane Traffic. *Annu. Rev. Biophys.* *40*, 119–142.

Husnjak, K., and Dikic, I. (2012). Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 291–322.

I

Im, Y.J., and Hurley, J.H. (2008). Integrated structural model and membrane targeting mechanism of the human ESCRT-II complex. *Dev. Cell* *14*, 902–913.

Itoh, F., Asao, H., Sugamura, K., Heldin, C.-H., Dijke, P. ten, and Itoh, S. (2001). Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *EMBO J.* *20*, 4132.

J

Johnston, S.C., Larsen, C.N., Cook, W.J., Wilkinson, K.D., and Hill, C.P. (1997). Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution. *EMBO J.* *16*, 3787–3796.

Jouvenet, N., Neil, S.J.D., Bess, C., Johnson, M.C., Virgen, C.A., Simon, S.M., and Bieniasz, P.D. (2006). Plasma Membrane Is the Site of Productive HIV-1 Particle Assembly. *PLoS Biol.* *4*.

Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P.D., and Simon, S.M. (2011). Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat. Cell Biol.* *13*, 394–401.

K

Kamadurai, H.B., Souphron, J., Scott, D.C., Duda, D.M., Miller, D.J., Stringer, D., Piper, R.C., and Schulman, B.A. (2009). Insights into ubiquitin transfer cascades from a structure of a UbcH5B approximately ubiquitin-HECT(NEDD4L) complex. *Mol. Cell* *36*, 1095–1102.

Kaneko, T., Kumasaka, T., Ganbe, T., Sato, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., and Tanaka, N. (2003). Structural insight into modest binding of a non-PXXP ligand to the signal transducing adaptor molecule-2 Src homology 3 domain. *J. Biol. Chem.* *278*, 48162–48168.

Kato, M., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (2000). A Deubiquitinating Enzyme UBPY Interacts with the Src Homology 3 Domain of Hrs-binding Protein via a Novel Binding Motif PX(V/I)(D/N)RXXKP. *J. Biol. Chem.* *275*, 37481–37487.

- Katoh, K., Shibata, H., Suzuki, H., Nara, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Yoshimori, T., and Maki, M. (2003). The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting. *J. Biol. Chem.* 278, 39104–39113.
- Katsiarimpa, A., Anzenberger, F., Schlager, N., Neubert, S., Hauser, M.-T., Schwechheimer, C., and Isono, E. The Arabidopsis Deubiquitinating Enzyme AMSH3 Interacts with ESCRT-III Subunits and Regulates Their Localization. *Plant Cell Online* 23, 3026–3040.
- Katzmann, D.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145–155.
- Katzmann, D.J., Odorizzi, G., and Emr, S.D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 893–905.
- Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J. Cell Biol.* 162, 413–423.
- Keren-Kaplan, T., Attali, I., Estrin, M., Kuo, L.S., Farkash, E., Jerabek-Willemsen, M., Blutraich, N., Artzi, S., Peri, A., Freed, E.O., et al. (2013). Structure-based in silico identification of ubiquitin-binding domains provides insights into the ALIX-V:ubiquitin complex and retrovirus budding. *EMBO J.* 32, 538–551.
- Kieffer, C., Skalicky, J.J., Morita, E., De Domenico, I., Ward, D.M., Kaplan, J., and Sundquist, W.I. (2008). Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Dev. Cell* 15, 62–73.
- Kikuchi, K., Ishii, N., Asao, H., and Sugamura, K. (2003). Identification of AMSH-LP containing a Jab1/MPN domain metalloenzyme motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 637–643.
- Kim, M.S., Kim, J.-A., Song, H.K., and Jeon, H. (2006). STAM–AMSH interaction facilitates the deubiquitination activity in the C-terminal AMSH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 612–618.
- Komander, D., and Barford, D. (2008). Structure of the A20 OTU domain and mechanistic insights into deubiquitination. *Biochem. J.* 409, 77–85.
- Komander, D., Clague, M.J., and Urbé, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 550.
- Kostelansky, M.S., Schluter, C., Tam, Y.Y.C., Lee, S., Ghirlando, R., Beach, B., Conibear, E., and Hurley, J.H. (2007). Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell* 129, 485–498.
- Kyuuma, M., Kikuchi, K., Kojima, K., Sugawara, Y., Sato, M., Mano, N., Goto, J., Takeshita, T., Yamamoto, A., Sugamura, K., et al. (2006). AMSH, an ESCRT-III Associated Enzyme, Deubiquitinates Cargo on MVB/Late Endosomes. *Cell Struct. Funct.* 31, 159–172.

L

- Lafaurie-Janvore, J., Maiuri, P., Wang, I., Pinot, M., Manneville, J.-B., Betz, T., Balland, M., and Piel, M. (2013). ESCRT-III assembly and cytokinetic abscission are induced by tension release in the intercellular bridge. *Science* 339, 1625–1629.

- Lange, A., Hoeller, D., Wienk, H., Marcillat, O., Lancelin, J.-M., and Walker, O. (2011). NMR Reveals a Different Mode of Binding of the Stam2 VHS Domain to Ubiquitin and Diubiquitin. *Biochemistry (Mosc.)* 50, 48–62.
- Lange, A., Castañeda, C., Hoeller, D., Lancelin, J.-M., Fushman, D., and Walker, O. (2012a). Evidence for Cooperative and Domain-specific Binding of the Signal Transducing Adaptor Molecule 2 (STAM2) to Lys63-linked Diubiquitin. *J. Biol. Chem.* 287, 18687–18699.
- Lange, A., Ismail, M.-B., Rivière, G., Hologne, M., Lacabanne, D., Guillièrre, F., Lancelin, J.-M., Krimm, I., and Walker, O. (2012b). Competitive binding of UBPY and ubiquitin to the STAM2 SH3 domain revealed by NMR. *FEBS Lett.* 586, 3379–3384.
- Langelier, C., Schwedler, U.K. von, Fisher, R.D., Domenico, I.D., White, P.L., Hill, C.P., Kaplan, J., Ward, D., and Sundquist, W.I. (2006). Human ESCRT-II Complex and Its Role in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Release. *J. Virol.* 80, 9465–9480.
- Lata, S., Roessle, M., Solomons, J., Jamin, M., Gottlinger, H.G., Svergun, D.I., and Weissenhorn, W. (2008a). Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *J. Mol. Biol.* 378, 818–827.
- Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Göttinger, H.G., and Weissenhorn, W. (2008b). Helical Structures of ESCRT-III Are Disassembled by VPS4. *Science* 321, 1354–1357.
- Lee, H.-J., Cho, E.-D., Lee, K.W., Kim, J.-H., Cho, S.-G., and Lee, S.-J. (2013). Autophagic failure promotes the exocytosis and intercellular transfer of α -synuclein. *Exp. Mol. Med.* 45, e22.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B., and Yarden, Y. (1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* 12, 3663–3674.
- Li, H., and Seth, A. (2004). An RNF11: Smurf2 complex mediates ubiquitination of the AMSH protein. *Oncogene* 23, 1801.
- Liu, Y., and Harty, R.N. (2010). Viral and host proteins that modulate filovirus budding. *Future Virol.* 5, 481–491.
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S., and Weissman, A.M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11364–11369.
- Lott, J.S., Coddington-Lawson, S.J., Teesdale-Spittle, P.H., and McDonald, F.J. (2002). A single WW domain is the predominant mediator of the interaction between the human ubiquitin-protein ligase Nedd4 and the human epithelial sodium channel. *Biochem. J.* 361, 481–488.

M

- Ma, Y.M., Boucrot, E., Villén, J., Affar, E.B., Gygi, S.P., Göttinger, H.G., and Kirchhausen, T. (2007). Targeting of AMSH to Endosomes Is Required for Epidermal Growth Factor Receptor Degradation. *J. Biol. Chem.* 282, 9805–9812.
- Martin-Serrano, J., and Neil, S.J.D. (2011). Host factors involved in retroviral budding and release. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 519–531.

- Martin-Serrano, J., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.* 7, 1313–1319.
- Martin-Serrano, J., Yarovoy, A., Perez-Caballero, D., Bieniasz, P.D., and Yaravoy, A. (2003). Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12414–12419.
- Mayers, J.R., Fyfe, I., Schuh, A.L., Chapman, E.R., Edwardson, J.M., and Audhya, A. (2011). ESCRT-0 Assembles as a Heterotetrameric Complex on Membranes and Binds Multiple Ubiquitinated Cargoes Simultaneously. *J. Biol. Chem.* 286, 9636–9645.
- McCullough, J., Clague, M.J., and Urbé, S. (2004). AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J. Cell Biol.* 166, 487–492.
- McCullough, J., Row, P.E., Lorenzo, Ó., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M.J., and Urbé, S. (2006). Activation of the Endosome-Associated Ubiquitin Isopeptidase AMSH by STAM, a Component of the Multivesicular Body-Sorting Machinery. *Curr. Biol.* 16, 160–165.
- McCullough, J., Fisher, R.D., Whitby, F.G., Sundquist, W.I., and Hill, C.P. (2008). ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7687–7691.
- McDonell, L.M., Mirzaa, G.M., Alcantara, D., Schwartzentruber, J., Carter, M.T., Lee, L.J., Clericuzio, C.L., Graham, J.M., Jr, Morris-Rosendahl, D.J., Polster, T., et al. (2013). Mutations in STAMBP, encoding a deubiquitinating enzyme, cause microcephaly-capillary malformation syndrome. *Nat. Genet.* 45, 556–562.
- Meijer, I.M.J., van Rotterdam, W., van Zoelen, E.J.J., and van Leeuwen, J.E.M. (2012). Recycling of EGFR and ErbB2 is associated with impaired Hrs tyrosine phosphorylation and decreased deubiquitination by AMSH. *Cell. Signal.* 24, 1981–1988.
- Messick, T.E., Russell, N.S., Iwata, A.J., Sarachan, K.L., Shiekhhattar, R., Shanks, J.R., Reyes-Turcu, F.E., Wilkinson, K.D., and Marmorstein, R. (2008). Structural basis for ubiquitin recognition by the Otu1 ovarian tumor domain protein. *J. Biol. Chem.* 283, 11038–11049.
- Metzger, M.B., Hristova, V.A., and Weissman, A.M. (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 531–537.
- Meulmeester, E., Kunze, M., Hsiao, H.H., Urlaub, H., and Melchior, F. (2008). Mechanism and consequences for paralog-specific sumoylation of ubiquitin-specific protease 25. *Mol. Cell* 30, 610–619.
- Missotten, M., Nichols, A., Rieger, K., and Sadoul, R. (1999). Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ.* 6, 124–129.
- Morita, E., and Sundquist, W.I. (2004). Retrovirus Budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 395–425.
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.-Y., Morham, S.G., Gygi, S.P., Rodesch, C.K., and Sundquist, W.I. (2007a). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J.* 26, 4215–4227.
- Morita, E., Sandrin, V., Alam, S.L., Eckert, D.M., Gygi, S.P., and Sundquist, W.I. (2007b). Identification of human MVB12 proteins as ESCRT-I subunits that function in HIV budding. *Cell Host Microbe* 2, 41–53.

Morita, E., Colf, L.A., Karren, M.A., Sandrin, V., Rodesch, C.K., and Sundquist, W.I. (2010). Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 12889–12894.

Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I., and Sundquist, W.I. (2011). ESCRT-III Protein Requirements for HIV-1 Budding. *Cell Host Microbe* *9*, 235–242.

Mukai, A., Mizuno, E., Kobayashi, K., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kitamura, N., and Komada, M. (2008). Dynamic regulation of ubiquitylation and deubiquitylation at the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Sci.* *121*, 1325–1333.

Muriaux, D., and Darlix, J.-L. (2010). Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. *RNA Biol.* *7*, 744–753.

Muzioł, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R.B., Zamborlini, A., Usami, Y., Göttlinger, H., and Weissenhorn, W. (2006). Structural Basis for Budding by the ESCRT-III Factor CHMP3. *Dev. Cell* *10*, 821–830.

N

Nakamura, M., Tanaka, N., Kitamura, N., and Komada, M. (2006a). Clathrin anchors deubiquitinating enzymes, AMSH and AMSH-like protein, on early endosomes. *Genes Cells* *11*, 593–606.

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 458–467.

Nanao, M.H., Tcherniuk, S.O., Chroboczek, J., Dideberg, O., Dessen, A., and Balakirev, M.Y. (2004). Crystal structure of human otubain 2. *EMBO Rep.* *5*, 783–788.

Nickerson, D.P., West, M., Henry, R., and Odorizzi, G. (2010). Regulators of Vps4 ATPase activity at endosomes differentially influence the size and rate of formation of intraluminal vesicles. *Mol. Biol. Cell* *21*, 1023–1032.

Nijman, S.M.B., Luna-Vargas, M.P.A., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M.G., Sixma, T.K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* *123*, 773–786.

O

Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D.J., Perisic, O., Emr, S.D., and Williams, R.L. (2007). Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* *449*, 735–739.

Oestreich, A.J., Davies, B.A., Payne, J.A., and Katzmann, D.J. (2007). Mvb12 is a novel member of ESCRT-I involved in cargo selection by the multivesicular body pathway. *Mol. Biol. Cell* *18*, 646–657.

Okumura, A., and Harty, R.N. (2011). Rabies virus assembly and budding. *Adv. Virus Res.* *79*, 23–32.

Ott, D.E., Coren, L.V., Copeland, T.D., Kane, B.P., Johnson, D.G., Sowder, R.C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L.O., and Henderson, L.E. (1998). Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag

proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* 72, 2962–2968.

Ott, D.E., Coren, L.V., Chertova, E.N., Gagliardi, T.D., and Schubert, U. (2000). Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology* 278, 111–121.

P

Pashkova, N., Gakhar, L., Winistorfer, S.C., Sunshine, A.B., Rich, M., Dunham, M.J., Yu, L., and Piper, R.C. (2013). The yeast alix homolog bro1 functions as a ubiquitin receptor for protein sorting into multivesicular endosomes. *Dev. Cell* 25, 520–533.

Patching, S.G. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*

Patnaik, A., Chau, V., and Wills, J.W. (2000). Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13069–13074.

Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N., and Weissenhorn, W. (2011). Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends Biochem. Sci.* 36, 199–210.

Perez-Caballero, D., Hatzioannou, T., Martin-Serrano, J., and Bieniasz, P.D. (2004). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix Inhibits and Confers Cooperativity on Gag Precursor-Membrane Interactions. *J. Virol.* 78, 9560–9563.

Petoukhov, M.V., and Svergun, D.I. (2005). Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys. J.* 89, 1237–1250.

Pickart, C.M., and Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1695, 55–72.

Pinder, J.B., Attwood, K.M., and Dellaire, G. (2013). Reading, writing, and repair: the role of ubiquitin and the ubiquitin-like proteins in DNA damage signaling and repair. *Front. Genet.* 4, 45.

Pineda-Molina, E., Belrhali, H., Piefer, A.J., Akula, I., Bates, P., Weissenhorn, W. (2006). The crystal structure of the C-terminal domain of Vps28 reveals a conserved surface required for Vps20 recruitment. *Traffic.* 7, 1007-1016

Piper, R.C., and Lehner, P.J. (2011). Endosomal Transportation via Ubiquitination. *Trends Cell Biol.* 21, 647–655.

Pires, R., Hartlieb, B., Signor, L., Schoehn, G., Lata, S., Roessle, M., Moriscot, C., Popov, S., Hinz, A., Jamin, M., et al. (2009). A Crescent-Shaped ALIX Dimer Targets ESCRT-III CHMP4 Filaments. *Structure* 17, 843–856.

Pollard, T.D. (2010). Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 50–56.

Popov, S., Popova, E., Inoue, M., and Göttinger, H.G. (2008). Human immunodeficiency virus type 1 Gag engages the Bro1 domain of ALIX/AIP1 through the nucleocapsid. *J. Virol.* 82, 1389–1398.

Pornillos, O., Alam, S.L., Rich, R.L., Myszk, D.G., Davis, D.R., and Sundquist, W.I. (2002). Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *EMBO J.* 21, 2397–2406.

Pornillos, O., Higginson, D.S., Stray, K.M., Fisher, R.D., Garrus, J.E., Payne, M., He, G.-P., Wang, H.E., Morham, S.G., and Sundquist, W.I. (2003). HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J. Cell Biol.* 162, 425–434.

Prag, G., Watson, H., Kim, Y.C., Beach, B.M., Ghirlando, R., Hummer, G., Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H. (2007). The Vps27/Hse1 complex is a GAT domain-based scaffold for ubiquitin-dependent sorting. *Dev. Cell* 12, 973–986.

Putnam, C.D., Hammel, M., Hura, G.L., and Tainer, J.A. (2007). X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q. Rev. Biophys.* 40, 191–285.

R

Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445–452.

Raiborg, C., Bache, K.G., Mehlum, A., Stang, E., and Stenmark, H. (2001). Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J.* 20, 5008–5021.

Reggiori, F., and Klionsky, D.J. (2002). Autophagy in the Eukaryotic Cell. *Eukaryot. Cell* 1, 11–21.

Ren, X., Kloer, D.P., Kim, Y.C., Ghirlando, R., Saidi, L.F., Hummer, G., and Hurley, J.H. (2009). Hybrid structural model of the complete human ESCRT-0 complex. *Struct. Lond. Engl.* 1993 17, 406–416.

Reyes-Ibarra, A.P., García-Regalado, A., Ramírez-Rangel, I., Esparza-Silva, A.L., Valadez-Sánchez, M., Vázquez-Prado, J., and Reyes-Cruz, G. (2007). Calcium-sensing receptor endocytosis links extracellular calcium signaling to parathyroid hormone-related peptide secretion via a Rab11a-dependent and AMSH-sensitive mechanism. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 1394–1407.

Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H., and Wilkinson, K.D. (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 363–397.

Row, P.E., Prior, I.A., McCullough, J., Clague, M.J., and Urbé, S. (2006). The Ubiquitin Isopeptidase UBPY Regulates Endosomal Ubiquitin Dynamics and Is Essential for Receptor Down-regulation. *J. Biol. Chem.* 281, 12618–12624.

Row, P.E., Liu, H., Hayes, S., Welchman, R., Charalabous, P., Hofmann, K., Clague, M.J., Sanderson, C.M., and Urbé, S. (2007). The MIT Domain of UBPY Constitutes a CHMP Binding and Endosomal Localization Signal Required for Efficient Epidermal Growth Factor Receptor Degradation. *J. Biol. Chem.* 282, 30929–30937.

Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2009). How do ESCRT proteins control autophagy? *J. Cell Sci.* 122, 2179–2183.

Rusten, T.E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L.M.W., Nezis, I.P., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J.-P., Brech, A., Bilder, D., et al. (2007). ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr. Biol. CB* 17, 1817–1825.

S

- Saad, J.S., Miller, J., Tai, J., Kim, A., Ghanam, R.H., and Summers, M.F. (2006). Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 11364–11369.
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E., and Emr, S.D. (2009). Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* *136*, 97–109.
- Sarkar, S., Ravikumar, B., Floto, R.A., and Rubinsztein, D.C. (2008). Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death Differ.* *16*, 46–56.
- Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., and Fukai, S. (2008). Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature* *455*, 358.
- Sette, P., Jadwin, J.A., Dussupt, V., Bello, N.F., and Bouamr, F. (2010). The ESCRT-associated protein Alix recruits the ubiquitin ligase Nedd4-1 to facilitate HIV-1 release through the LYPXnL domain motif. *J. Virol.* *84*, 8181–8192.
- Sette, P., Nagashima, K., Piper, R.C., and Bouamr, F. (2013). Ubiquitin conjugation to Gag is essential for ESCRT-mediated HIV-1 budding. *Retrovirology* *10*, 79.
- Shim, S., Merrill, S.A., and Hanson, P.I. (2008). Novel interactions of ESCRT-III with LIP5 and VPS4 and their implications for ESCRT-III disassembly. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2661–2672.
- Sierra, M.I., Wright, M.H., and Nash, P.D. (2010). AMSH Interacts with ESCRT-0 to Regulate the Stability and Trafficking of CXCR4. *J. Biol. Chem.* *285*, 13990–14004.
- Slagsvold, T., Aasland, R., Hirano, S., Bache, K.G., Raiborg, C., Trambaiolo, D., Wakatsuki, S., and Stenmark, H. (2005). Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J. Biol. Chem.* *280*, 19600–19606.
- Snyder, P.M., Olson, D.R., McDonald, F.J., and Bucher, D.B. (2001). Multiple WW domains, but not the C2 domain, are required for inhibition of the epithelial Na⁺ channel by human Nedd4. *J. Biol. Chem.* *276*, 28321–28326.
- Solomons, J., Sabin, C., Poudevigne, E., Usami, Y., Hulsik, D.L., Macheboeuf, P., Hartlieb, B., Göttlinger, H., and Weissenhorn, W. (2011). Structural Basis for ESCRT-III CHMP3 Recruitment of AMSH. *Structure* *19*, 1149–1159.
- Son, J.H., Shim, J.H., Kim, K.-H., Ha, J.-Y., and Han, J.Y. (2012). Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp. Mol. Med.* *44*, 89–98.
- Stahelin, R.V., Long, F., Diraviyam, K., Bruzik, K.S., Murray, D., and Cho, W. (2002). Phosphatidylinositol 3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vps27p and Hrs. *J. Biol. Chem.* *277*, 26379–26388.
- Stefani, F., Zhang, L., Taylor, S., Donovan, J., Rollinson, S., Doyotte, A., Brownhill, K., Bennion, J., Pickering-Brown, S., and Woodman, P. (2011). UBAP1 is a component of an endosome-specific ESCRT-I complex that is essential for MVB sorting. *Curr. Biol. CB* *21*, 1245–1250.
- Strack, B., Calistri, A., Accola, M.A., Palu, G., and Gottlinger, H.G. (2000). A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 13063–13068.
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., and Göttlinger, H.G. (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* *114*, 689–699.

Stuchell-Brereton, M.D., Skalicky, J.J., Kieffer, C., Karren, M.A., Ghaffarian, S., and Sundquist, W.I. (2007). ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* 449, 740–744.

Suzuki, S., Tamai, K., Watanabe, M., Kyuuma, M., Ono, M., Sugamura, K., and Tanaka, N. (2011). AMSH is required to degrade ubiquitinated proteins in the central nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 582–588.

T

Tanaka, N., Kaneko, K., Asao, H., Kasai, H., Endo, Y., Fujita, T., Takeshita, T., and Sugamura, K. (1999). Possible Involvement of a Novel STAM-associated Molecule “AMSH” in Intracellular Signal Transduction Mediated by Cytokines. *J. Biol. Chem.* 274, 19129–19135.

Teis, D., Saksena, S., and Emr, S.D. (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev. Cell* 15, 578–589.

Teis, D., Saksena, S., Judson, B.L., and Emr, S.D. (2010). ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO J.* 29, 871–883.

Teo, H., Veprintsev, D.B., and Williams, R.L. (2004a). Structural insights into endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) recognition of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 28689–28696.

Teo, H., Perisic, O., González, B., and Williams, R.L. (2004b). ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev. Cell* 7, 559–569.

Tsang, H.T.H., Connell, J.W., Brown, S.E., Thompson, A., Reid, E., and Sanderson, C.M. (2006). A systematic analysis of human CHMP protein interactions: Additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics* 88, 333–346.

U

Urbé, S., McCullough, J., Row, P., Prior, I.A., Welchman, R., and Clague, M.J. (2006). Control of growth factor receptor dynamics by reversible ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 754–756.

Usami, Y., Popov, S., and Göttlinger, H.G. (2007). Potent rescue of human immunodeficiency virus type 1 late domain mutants by ALIX/AIP1 depends on its CHMP4 binding site. *J. Virol.* 81, 6614–6622.

Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W., and G. Göttlinger, H. (2009). The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 181.

V

VerPlank, L., Bouamr, F., LaGrassa, T.J., Agresta, B., Kikonyogo, A., Leis, J., and Carter, C.A. (2001). Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7724–7729.

Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E., and Cook, W.J. (1987). Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 194, 531–544.

Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr, and Peñalva, M.A. (2003). YPXL/I is a protein interaction motif recognized by aspergillus PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1647–1655.

W

Weiss, E.R., Popova, E., Yamanaka, H., Kim, H.C., Huibregtse, J.M., and Göttlinger, H. (2010). Rescue of HIV-1 release by targeting widely divergent NEDD4-type ubiquitin ligases and isolated catalytic HECT domains to Gag. *PLoS Pathog.* 6, e1001107.

Weissenhorn, W., Poudevigne, E., Effantin, G., and Bassereau, P. (2013). How to get out: ssRNA enveloped viruses and membrane fission. *Curr. Opin. Virol.* 3, 159–167.

Wickliffe, K., Williamson, A., Jin, L., and Rape, M. (2009). The multiple layers of ubiquitin-dependent cell cycle control. *Chem. Rev.* 109, 1537–1548.

Wollert, T., and Hurley, J.H. (2010). Molecular Mechanism of Multivesicular Body Biogenesis by ESCRT Complexes. *Nature* 464, 864–869.

Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., and Hurley, J.H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458, 172–177.

Wright, E.R., Schooler, J.B., Ding, H.J., Kieffer, C., Fillmore, C., Sundquist, W.I., and Jensen, G.J. (2007). Electron cryotomography of immature HIV-1 virions reveals the structure of the CA and SP1 Gag shells. *EMBO J.* 26, 2218–2226.

X

Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J. (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* 137, 133–145.

Y

Yang, D., Rismanchi, N., Renvoisé, B., Lippincott-Schwartz, J., Blackstone, C., and Hurley, J.H. (2008). Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 1278–1286.

Ye, Y., and Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 755–764.

Z

Zamborlini, A., Usami, Y., Radoshitzky, S.R., Popova, E., Palu, G., and Göttlinger, H. (2006). Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 19140–19145.

Zhadina, M., McClure, M.O., Johnson, M.C., and Bieniasz, P.D. (2007). Ubiquitin-dependent virus particle budding without viral protein ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20031–20036.

Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (2000). Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* 102, 533–539.

Zhou, W., Parent, L.J., Wills, J.W., and Resh, M.D. (1994). Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* 68, 2556–2569.

Annexes

Publication 1

Structural Basis for ESCRT-III CHMP3 Recruitment of AMSH

Structural Basis for ESCRT-III CHMP3 Recruitment of AMSH

Julianna Solomons,^{1,3} Charles Sabin,^{1,3} Emilie Poudevigne,¹ Yoshiko Usami,² David Lutje Hulsik,¹ Pauline Macheboeuf,¹ Bettina Hartlieb,¹ Heinrich Göttlinger,² and Winfried Weissenhorn^{1,*}

¹Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI) UMI 3265 Université Joseph Fourier-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz 38042 Grenoble Cedex 9, France

²Program in Gene Function and Expression, Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

³These authors contributed equally to this work

*Correspondence: weissenhorn@embl.fr

DOI 10.1016/j.str.2011.05.011

SUMMARY

Endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) recognize ubiquitinated cargo and catalyze diverse budding processes including multivesicular body biogenesis, enveloped virus egress, and cytokinesis. We present the crystal structure of an N-terminal fragment of the deubiquitinating enzyme AMSH (AMSHDC) in complex with the C-terminal region of ESCRT-III CHMP3 (CHMP3DN). AMSHDC folds into an elongated 90 Å long helical assembly that includes an unusual MIT domain. CHMP3DN is unstructured in solution and helical in complex with AMSHDC, revealing a novel MIT domain interacting motif (MIM) that does not overlap with the CHMP1-AMSH binding site. ITC and SPR measurements demonstrate an unusual high-affinity MIM-MIT interaction. Structural analysis suggests a regulatory role for the N-terminal helical segment of AMSHDC and its destabilization leads to a loss of function during HIV-1 budding. Our results indicate a tight coupling of ESCRT-III CHMP3 and AMSH functions and provide insight into the regulation of ESCRT-III.

INTRODUCTION

Internalization of plasma membrane receptors by endocytosis is regulated by ubiquitination and leads to receptor sorting into intraluminal vesicles at the endosome giving rise to multivesicular bodies (Babst, 2005; Saxena et al., 2007; van der Goot and Gruenberg, 2006). The sorting process is catalyzed by ESCRTs (endosomal sorting complexes required for transport) and their associated molecules (Hurley, 2008; Peel et al., 2011; Saxena et al., 2007). Part of the same machinery is recruited by some enveloped viruses to facilitate budding (Bieniasz, 2009; Hartlieb and Weissenhorn, 2006; Morita and Sundquist, 2004; Usami et al., 2009) and during cytokinesis of eukaryotes (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Carlton and Martin-Serrano, 2009; Morita et al., 2007) and Crenarchaea (Ghazi-Tabatabai et al., 2009; Lindás et al., 2008).

The ESCRT pathway is linked to the activity of deubiquitinating enzymes (deubiquitinase, DUB, or ubiquitin hydrolase or deubiquitylating enzyme) in order to maintain a constant pool of ubiquitin (Komander et al., 2009). DUB Doa4 has an essential recycling role in the yeast MVB pathway (Amerik et al., 2000) and controls the function of ESCRTs (Nikko and André, 2007). The mammalian MVB pathway employs several DUBs including AMSH (associated molecule with the Src homology 3 domain of STAM, also known as STAMBP) (McCullough et al., 2004), AMSH-LP (AMSH-like protein) (Sato et al., 2008), and UBPY (Ub-specific protease Y) (Alwan and van Leeuwen, 2007). Both AMSH and UBPY are recruited early in the pathway via interaction with the ESCRT-0 subunit STAM (McCullough et al., 2006; Mizuno et al., 2006; Row et al., 2006) and their localization to early endosomes is supported by interaction with the clathrin heavy chain (Nakamura et al., 2006).

Deubiquitination by AMSH is thought to precede cargo incorporation into MVB vesicles and lysosomal degradation (Alwan et al., 2003; Dupré and Hagenauer-Tsapir, 2001). Depletion of AMSH was reported to increase degradation of epidermal growth factor receptor (EGFR) (McCullough et al., 2004). In contrast a dominant-negative form of CHMP3 prevents AMSH localization to the endosome, which, in turn, inhibits EGFR degradation (Ma et al., 2007). Other studies implicate UBPY in the control of EGFR ubiquitination (Alwan and van Leeuwen, 2007; Mizuno et al., 2005; Row et al., 2006). Besides EGFR, AMSH is involved in downregulation of the calcium-sensing receptor (Reyes-Ibarra et al., 2007), G protein-coupled receptors (Hislop et al., 2009), the protease-activated receptor 2 (Hasdemir et al., 2009), and the CXCR4 chemokine receptor (Sierra et al., 2010). The latter study suggests that AMSH not only regulates cargo ubiquitination but also ubiquitination of the endocytic machinery (Sierra et al., 2010). Furthermore, depletion of AMSH leads to defects in cytokinesis (Mukai et al., 2008) and inactive AMSH exerts a dominant-negative effect on retrovirus budding (Agromayor and Martin-Serrano, 2006; Zamborini et al., 2006).

The N terminus of AMSH is predicted to contain a MIT domain (Tsang et al., 2006). This is followed by a central proline-rich region providing the framework for STAM SH3 domain binding (Tanaka et al., 1999), which was suggested to control the isopeptidase activity of the C-terminal JAMM domain, a metalloprotease with specificity for K63-linked polyubiquitin chains (McCullough et al., 2006; Sato et al., 2008). AMSH interacts

with ESCRT-III CHMP1 (Agromayor and Martin-Serrano, 2006; Tsang et al., 2006), CHMP2A and CHMP3 (Agromayor and Martin-Serrano, 2006; Kyuuma et al., 2007; Ma et al., 2007; McCullough et al., 2006; Tsang et al., 2006; Zamborlini et al., 2006) as well as Ist1 (Agromayor et al., 2009). ESCRT-III proteins are autoinhibited in the cytosol (Bajorek et al., 2009; Lata et al., 2008a; Zamborlini et al., 2006). Activation leads to membrane interaction (Muziol et al., 2006; Shim et al., 2007) and polymerization in vitro (Bajorek et al., 2009; Ghazi-Tabatabai et al., 2008; Lata et al., 2008b; Pires et al., 2009) and in vivo inducing membrane deformation (Hanson et al., 2008). Current models implicate ESCRT-I and II in vesicle formation (Wollert and Hurley, 2010), while the ordered assembly of ESCRT-III catalyzes membrane fission (Fabrikant et al., 2009; Saksena et al., 2009; Teis et al., 2008; Wollert et al., 2009). ESCRT-III proteins contain MIT domain interacting motifs (MIMs) within their C termini which bind to MIT domains of VPS4 and spastin (Kieffer et al., 2008; Obita et al., 2007; Stuchell-Brereton et al., 2007; Yang et al., 2008).

In order to understand the structural basis of the AMSH-CHMP3 interaction, we defined an N-terminal AMSH domain (AMSHDC) by proteolysis that allowed the isolation of a soluble complex with a C-terminal fragment of CHMP3. The crystal structure of AMSHDC-CHMP3DN reveals an unconventional MIT domain within AMSHDC. The CHMP3 C terminus adopts a helical conformation upon binding and the molecular details of the interaction provide a novel MIM sequence motif. Although CHMP3 binds with high affinity to AMSH, ESCRT-III CHMP1A and B show only micromolar interactions. Mutagenesis studies suggest further that AMSH employs a different molecular surface for CHMP1 interaction. Structural analyses indicate that the N-terminal helix preceding the MIT domain is mobile consistent with data demonstrating that this region might control the activity of AMSH during HIV-1 budding. Although the CHMP3-AMSH interaction site overlaps with the VPS4 binding site the high K_D renders it unlikely to be displaced by VPS4.

RESULTS

Determination of a Minimal AMSH-CHMP3 Complex

Trypsin proteolysis of the AMSH(1-206)-CHMP3 complex described previously (Lata et al., 2008a) was used to identify AMSH residues 1 to 146 (AMSHDC) as a stable core fragment. N-terminally His-tagged AMSHDC showed limited solubility on its own but produced a monodisperse complex in association with a C-terminal fragment of CHMP3 containing residues 183 to 222 (CHMP3DN). The AMSHDC-CHMP3DN complex was purified by size exclusion chromatography and complex formation was confirmed by detection of the CHMP3DN peptide in the elution peak by mass spectrometry.

In order to compare the affinity of AMSH to CHMP3DN with previous measurements employing full-length CHMP3 (Lata et al., 2008a), MBP-AMSH(1-206) was used for ITC analysis with CHMP3DN, which produced an equilibrium dissociation constant (K_D) of $63 \pm \text{nM}$ (enthalpy $\Delta H = 15.1 \pm 0.09 \text{ kcal/mol}$) (see Figures S1A and S1B available online). MBP-AMSH(1-146) was constructed to determine whether a shorter form of AMSH influences binding to CHMP3DN. SPR measurements with His-MBP-CHMP3DN coupled to the chip and MBP-AMSHDC as

Table 1. Data Collection and Refinement Statistics

	Native	SeMet
Data collection		
Space group	P4 ₁	P4 ₁
Cell dimensions		
a = b, c (Å)	45.97, 206.91	45.92, 206.90
		Peak
Wavelength (Å)	0.9760	0.9795
Resolution (Å)	44.86Å 1.75 (1.84–1.75)	69.84–2.90 (3.06–2.90)
R _{merge}	0.08 (0.64)	0.14 (0.52)
I / σ I	5.1 (1.2)	5.1 (1.4)
Completeness (%)	99.8 (100.0)	99.9 (100.0)
Redundancy	3.3 (3.3)	4.1 (4.2)
Refinement		
Resolution (Å)	1.75	
No. reflections	141,404 (20,743)	
R _{work} / R _{free}	0.19/0.23	
No. atoms		
Protein	2698	
Water	386	
B-factors		
Protein	32.56	
Water	45.55	
Rmsd		
Bond lengths (Å)	0.02	
Bond angles (°)	1.29	

Values in parentheses are for highest resolution shell.

analyte revealed a K_D of 113 nM based on the association constant (k_a) of $6.79 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and the dissociation constant (k_d) of $7.64 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ confirming the high-affinity interaction observed with the longer AMSH(1-206) construct (Figure S1C).

Structure of the AMSHDC-CHMP3DN Complex

The structure of AMSHDC in complex with CHMP3DN was determined from a selenomethionine-containing crystal using the single wavelength anomalous dispersion method and diffraction data to 1.75 Å (Table 1). This resulted in a readily interpretable electron density map (Figure 1A) revealing two complexes in the asymmetric crystal unit. AMSHDC folds into a 90 Å long elongated helical assembly (Figure 1B). The N-terminal α-helical segment 1 folds back onto a helices 2 and 5 which are followed by an extended conformation. Helices 2, 3, and 4–5 form a three helical bundle structure reminiscent of a MIT domain although a break in helix 4 at Ile 98 disrupts the helical continuity of the third helix. The latter extends far beyond the core of the MIT domain and spans a distance of 90 Å (Figure 1B). However, the conserved features of a MIT domain are evident from superpositioning of the Ca atoms with the structure of the VPS4 MIT domain revealing a rmsd of 2.6 Å (Figure 1C).

CHMP3DN residues 200–222 adopt a helical conformation in the complex burying the solvent-accessible surface of 1659 Å^2 on AMSHDC and CHMP3DN, while CHMP3DN is unstructured in solution (Figure S2A). It is likely more structured in full-length

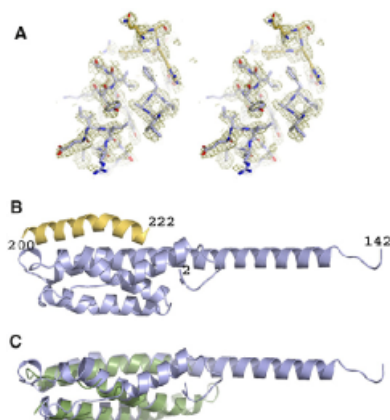


Figure 1. Crystal Structure of AMSH in Complex with CHMP3
(A) Stereo image of the experimental electron density map obtained after SAD phasing.
(B) Ribbon representation of AMSHDC (blue) in complex with CHMP3DN residues 200–222 (yellow).
(C) Overlay of the Ca atoms of AMSHDC (blue) with the VPS4 MIT domain (PDB 2JQ9) (green ribbon).

CHMP3, since the overall helical content is slightly higher for full-length CHMP3 (60% α -helical corresponding to 133 residues) compared with CHMP3(9–183) (68% α -helical corresponding to 119 residues) (Figure S2B), although both proteins reveal similar melting temperatures of 560°C indicating that the C terminus does not contribute substantially to the stability of CHMP3 in the autoinhibited form (Figure S2C). CHMP3DN interacts with the MIT domain of AMSH diagonal along a groove made up by helices 3 and 4/5. The orientation of interaction is parallel with respect to the positions of both C termini (Figure 1B). CHMP3DN residues 184–199 do not contribute to the interaction and are disordered in the structure. The complex is stabilized by a hydrogen bond between Glu207 and Tyr80 and salt bridges between Glu203–Lys88, Arg216–Glu104, and Arg221–Glu72. The last C-terminal residue, Ser222, of CHMP3 is capped by AMSHDC Lys107, which forms a salt bridge with the carboxyl group of Ser222 and hydrogen bonds with the carbonyls of Thr219 and Leu220 (Figure 2A). Hydrophobic contacts play a minor role and include Leu210 interactions with Ile71 and Tyr80 as well as Leu220 contacts with Asn64 and Lys107 (Figure 2B). Mutagenesis of AMSH interface residues Lys88, Glu104, and Lys107 to Ala confirmed the importance of the salt bridges and hydrogen bonds for interaction. While AMSHDC-K88A recovered a faint amount of CHMP3 in a pull-down, AMSHDC-E104A and AMSHDC-K107A failed to pull down CHMP3 (Figure 2C). The effect of the mutations on binding were confirmed by SPR. AMSHDC-K88A produced a K_D of 1.2 nM (k_a $2.8 \pm 0.094 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ and k_d of $3.1 \pm 0.033 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$) and AMSHDC-E104A a K_D of 5.2 nM (k_a $0.42 \pm 0.016 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ and k_d of $2.2 \pm 0.029 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$). Thus, both mutations reduced binding by a factor 30 and 130, respectively, compared

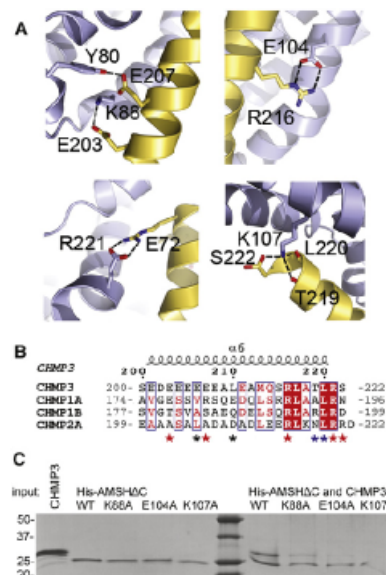


Figure 2. The CHMP3N-AMSHDC Interaction Is Dominated by Polar Contacts

(A) Closeup of the CHMP3-AMSH interactions. Hydrogen bonds and salt bridges along the CHMP3 helical segment mediate high-affinity interaction.
(B) Sequence alignment of the C-terminal regions of CHMP3, CHMP1A, CHMP1B, and CHMP2A. CHMP3 residues contacting AMSH are indicated by red asterisks (polar contact), blue asterisks (main chain polar contacts), and black asterisks (hydrophobic contacts).
(C) Pull-down of CHMP3 by wild-type and mutant His-AMSHDC confirms the essential role of polar interactions. The left panel of the SDS-PAGE shows the input proteins and the right panel the pull-down of CHMP3 by wild-type and mutant His-AMSHDC, as indicated. The K88A mutant reveals a strongly reduced interaction with CHMP3 and the E104A and K107A mutants show a complete loss of interaction in this assay.

with the 40 nM K_D of wild-type AMSHDC employing the same SPR setup. Notably, the mutations did not change the cellular localization when introduced into GFP-AMSH(D348A) (Figure S3), indicating that they did not alter the overall structure.

Previous crystal structures of MIT-CHMP interactions reveal an important role for hydrophobic ESCRT-III MIM residues (Kieffer et al., 2008; Obita et al., 2007; Stuchell-Brereton et al., 2007; Yang et al., 2008), while the AMSHDC-CHMP3DN structure highlights the importance of polar interactions leading to a novel MIM sequence motif (Table 2). Because CHMP1A, CHMP1B, and CHMP2A were reported to interact with AMSH (Agromayor and Martin-Serrano, 2006; Tsang et al., 2006), the limited sequence conservation with CHMP3 (Figure 2B) predicts that either they bind AMSH similarly, but with lower affinity, or they use a different strategy for interaction. Accordingly SPR measurements showed a much lower affinity for CHMP1A and CHMP1B interaction with AMSH (Figure S1D). Both GST-CHMP1ADN and GST-CHMP1BDN bound to the analyte

Table 2. ESCRT-III MIT Domain Interacting Motifs

MIM1	Lx ₂ RLxxLR	a 2, 3	CHMP1B, 2B	VPS4	(Stuchell-Brereton et al., 2007)
MIM4	Ex ₃ Ex ₂ V x ₂ V x ₂ RLxTLRx	a 3, 4/5	CHMP3	AMSH	
MIM1	E/Dx ₂ Lx ₂ RLxxLK/R	a 2, 3	Vps2, Did2	VPS4	(Obita et al., 2007)
MIM2	VxLPxVPSx ₂ LP	a 1, 3	CHMP4, 6	VPS4	(Kieffer et al., 2008)
MIM2	RxxLxPxLPxPP	a 1, 3	Saci1337	Saci1372	(Samson et al., 2008)
MIM3	Sx ₂ TSxAx ₂ EQDx ₂ SxRV	a 1, 3	CHMP1B	spastin	(Yang et al., 2008)

The motifs have been either reported in the cited literature or deduced from the structures reporting the corresponding contact residues.

MBP-AMSH(1-206) with K_D s of 1.49 and 1.16 nM, respectively, based on the association constants (k_a) of $3.89 \pm 0.06 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CHMP1A) and $2.52 \pm 0.03 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CHMP1B) and the dissociation constants (k_d) of $5.81 \pm 0.09 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (CHMP1A) and $2.92 \pm 0.08 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (CHMP1B). Probing AMSH mutants AMSHDC-K88A and AMSHDC-E104A for CHMP1B interaction demonstrates that both mutants are still capable to pull down GST-CHMP1BDN (Figure S1E); this might indicate that AMSH employs different interaction surfaces for CHMP1B and CHMP3. Furthermore the AMSH binding site overlaps with the VPS4 site on CHMP3 (Table 2) (Obita et al., 2007; Stuchell-Brereton et al., 2007), consistent with the finding that AMSH CHMP3 and VPS4 binding are exclusive (data not shown).

Structural Homology of the N-Terminal Domains of AMSH and USP8

A search for homologous structures (Dietmann et al., 2002) revealed high similarity to the N-terminal domain of the ubiquitin-specific protease 8 (USP8, also known as UBPY, Ubiquitin-specific protease Y) (Avvakumov et al., 2006) as evidenced by the rmsd of 2.9 Å upon overlay of the Ca backbone (Figure 3A). The main difference between both structures is the detachment of the N-terminal segment including a helix 1 from the core, which mediates dimerization in case of USP8 (Avvakumov et al., 2006). The N-terminal region (residues 1–27) of AMSH is only stabilized by a hydrogen bond between His4 and Glu57 and a salt bridge between Arg14 and Glu117 (Figure 3B). Although the N-terminal sequence of AMSH and UBPY diverge substantially (Figure 4), it is possible that the N terminus of

AMSH might be able to detach and adopt a similar conformation as in case of UBPY and vice versa the N terminus of UBPY might attach to the core as observed for AMSHDC. Thus the two conformations observed in both structures might be part of a common conformational control mechanism of AMSH and USP8/UBPY.

The N-Terminal Helix 1 of AMSH Is Required for HIV-1 Budding

It has been previously shown that expression of catalytically inactive AMSH fused to GFP or YFP alone or in coexpression with full-length CHMP3 induces a dominant-negative effect on HIV-1 and MLV budding (Agromayor and Martin-Serrano, 2006; Zamborlini et al., 2006). Expression of catalytically inactive GFP-AMSH(D348A) had a mild effect on the kinetic of HIV-1 release as indicated by the accumulation of the Gag cleavage intermediates CAp2 and p41 (Figure 5A, right panel, lane 3) that define late assembly defects (Garrus et al., 2001; Göttinger et al., 1991). However, coexpression of GFP-AMSH(D348A) with CHMP3-Flag almost completely blocked HIV-1 release as indicated by the absence of CA in the supernatant (Figure 5A, left panel, lane 4) and the enhanced defect in Gag processing (Figure 5A, right panel, lane 4). Notably the intracellular distribution of GFP-AMSH(D348A) resembles that of wild-type AMSH-HA when coexpressed with CHMP3-Flag (Figures 6A and 6B). Mutation of the N-terminal residues His4Ala and Arg14Ala that stabilize the interaction with the core (Figure 3B) within GFP-AMSH(D348A) leads to the loss of the dominant effect when expressed alone or in combination with CHMP3-Flag as indicated by the wild-type-like release of CA into the supernatant and normal intracellular Gag processing (Figure 5A, lanes 5 and 6). GFP-AMSH(D348A-H4R14A) expression levels were slightly reduced in comparison to GFP-AMSH(D348A) (Figure 5A, lower panel). GFP-AMSH(D348A-H4R14A) expression was also altered from mostly cytoplasmic staining to accumulation at a perinuclear region without notable concentration of CHMP3-Flag (Figure 6C). Because the previous experiment showed that a strong dominant-negative effect of GFP-AMSH(D348A) depends on CHMP3 expression, we tested whether GST-CHMP3(151-222) can pull down the N-terminal mutant (GFP-AMSH[D348A-H4R14A]), which is no longer the case. Only a faint band could be detected for the N-terminal mutant in comparison to GFP-AMSH(D348A). Notably GFP-AMSH(D348A-H4R14A) showed a lower expression level than GFP-AMSH(D348A) (Figure 5B).

Expression of N-terminally MBP-tagged full-length AMSH in *Escherichia coli* produced polydisperse AMSH, while recombinant AMSH expressed without tag was monodisperse,

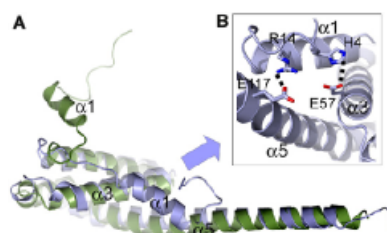


Figure 3. Superpositioning of the Ca Atoms of AMSH and UBPY Reveal a Regulatory Role of the N-Terminal Regions of AMSH and UBPY

(A) Ribbon representation of the Ca overlay of AMSHDC (blue) and UBPY (green) (PDB code 2A9U). (B) Close up of the two main contacts between AMSH helix 1 and helices 3 and 5 of the core.

Structure

Crystal Structure of AMSH-CHMP3

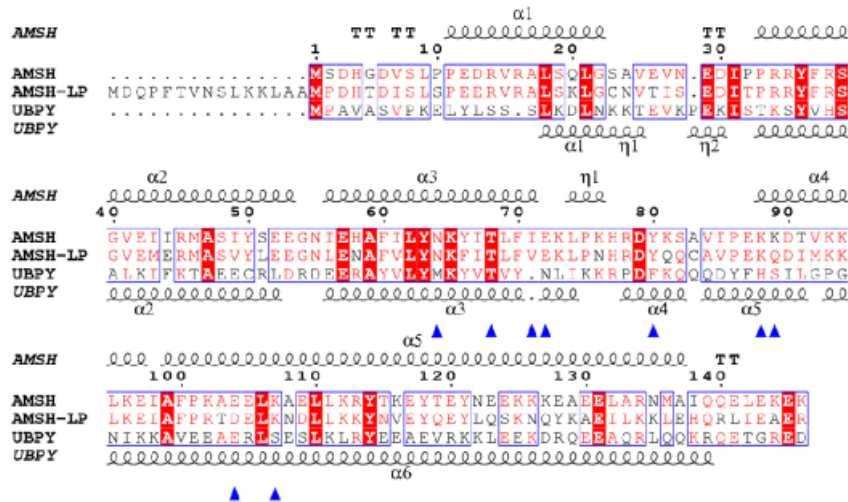


Figure 4. Sequence and Secondary Structure Alignment of AMSH, AMSH-LP, and UBPY

Human AMSH (accession code AAD05037) residues 1–146 were aligned to the corresponding fragments of AMSH-LP (accession code BAC77766) and UBPY (accession code AAI10591). Residues contacting CHMP3 are indicated with blue triangles. Note that the CHMP3 contact residues are conserved between AMSH and AMSH-LP but not UBPY. Secondary structures are shown for AMSH and UBPY (PDB code 2A9U).

indicating that N-terminal fusions of AMSH induce the formation of polydisperse AMSH in vitro (Figure S4). This led us to perform the HIV-1 budding assay with catalytic inactive AMSH containing a C-terminal HA-tag instead of a N-terminal GFP-tag in the presence and absence of CHMP3 expression. The results indicate that expression of the catalytic inactive AMSH(HH_{335,337}QQ)-HA or CHMP3 alone has no effect on virus particle production as measured by the detection of CA in the supernatant (Figure 5C, left panel, lanes 1A3). Only coexpression of both proteins leads to a slight reduction in virion release and defects in intracellular Gag processing (Figure 5C, lanes 3 and 4). This minor assembly defect is lost, when AMSH(HH_{335,337}QQ)-HA containing the N-terminal double mutant (His₄Ala, Arg₁₄Ala) is coexpressed with CHMP3 since no reduction in particle production is observed, consistent with the lack of intracellular Gag processing defects (Figure 5C, lanes 5 and 6). The expression levels of AMSH constructs were comparable (Figure 5C, lower panel) and AMSH(HH_{335,337}QQ)-HA shows cytoplasmic staining when coexpressed with CHMP3, similar to wild-type AMSH-HA (Figures 6D and 6E). This indicates that the N-terminal fusion of GFP is responsible for the dominant-negative effect of catalytic inactive AMSH when coexpressed with CHMP3 and this function is lost upon destabilization of the N-terminal region, indicating that the His₄Ala and Arg₁₄Ala positions are important for supporting the dominant-negative effect.

DISCUSSION

Deubiquitinating enzymes (DUBs) AMSH and UBPY targeting ESCRT-III play an important role in ESCRT-regulated processes

(Komander et al., 2009; McDonald and Martin-Serrano, 2009; Raiborg and Stenmark, 2009) and many ESCRT-III interaction partners recognize sequence motifs located within the C terminus of ESCRT-III family members (Agromayor and Martin-Serrano, 2006; Obita et al., 2007; Scott et al., 2005; Stuchell-Brereton et al., 2007; Yang et al., 2008; Zamborlini et al., 2006). The crystal structure of AMSH in complex with CHMP3 demonstrates that the C-terminal CHMP3 MIM adopts a helical conformation, which is induced by complex formation, since the same peptide is unstructured in solution. However our CD analysis also suggest that part of it might be structured within full-length CHMP3 and thus contribute to the autoinhibited conformation of CHMP3 (Bajorek et al., 2009; Lata et al., 2008a; Zamborlini et al., 2006). The structure of AMSH contains a region that resembles a MIT domain as predicted (Tsang et al., 2006), which interacts with the CHMP3 MIM. However, we propose that the structure does not qualify as a classical MIT domain (Scott et al., 2005), due to the presence of an N-terminal region including helix 1 and because of the 90 Å-long extension of helix 5 (corresponding to helix 3 of a MIT domain). This is further supported by the poor solubility of the MIT-like domain of AMSH on its own and by AMSHDC lacking helix 1 in vitro (J.S. and W.W., unpublished data). However, the general mode of target recognition is similar to that of MIT domains. CHMP3 binds in a helical conformation diagonal along a groove made up by helices 3 (VPS4 MIT helix 2) and 4/5 (VPS4 MIT helix 3). The AMSH-CHMP3 interaction site resembles VPS4 interactions with CHMP1A or yeast Vps2p, which employ helices 2 and 3 for the recognition of a shorter helical motif (MIM 1) (Stuchell-Brereton et al., 2007) (Obita et al., 2007). In contrast the spastin MIT

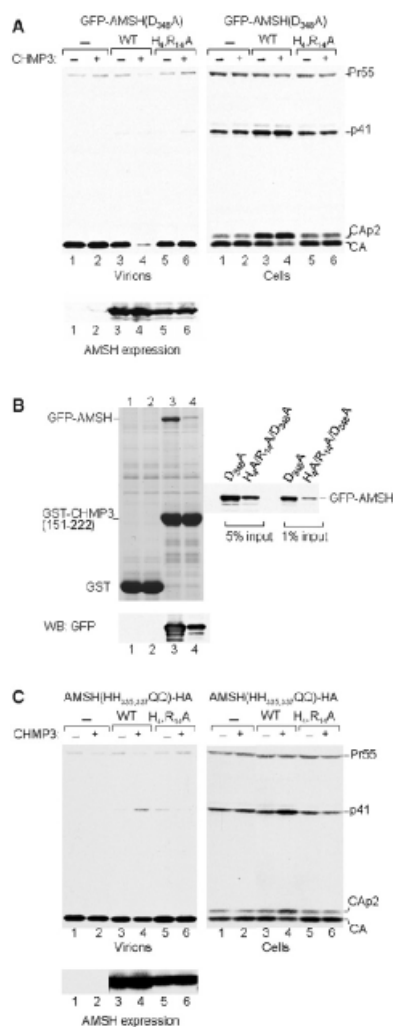


Figure 5. Catalytic Inactive AMSH and CHMP3 Expression Inhibit HIV-1 Budding

(A) (Left panel) Expression of catalytically inactive GFP-AMSH(D348A) exerts a strong effect on HIV-1 budding when coexpressed with CHMP3 (lanes 3 and 4). In contrast expression of GFP-AMSH(D348A-H4R14A) alone or in combination with CHMP3 has no effect on budding (lanes 5 and 6) comparable to vector expression (lane 1) or CHMP3 expression alone (lane 2). (Right panel) Western blot revealing the intracellular Gag processing. Only expression of GFP-AMSH(D348A) alone and together with CHMP3 show a defect in intracellular Gag processing (lanes 3 and 4), while the N-terminal mutant GFP-AMSH(D348A-H4R14A) resembles the negative control (lane 1) and CHMP3 expression (lane 2). (Lower panel) Western blot showing the expression levels of the AMSH constructs.

domain interacts with a helical segment of CHMP1B via its helices 1 and 3 (Yang et al., 2008). The same groove between helices 1 and 3 is employed by VPS4 to bind the CHMP6 MIM2 motif (Kieffer et al., 2008) and by Vps4 (Saci1372) from *Crenarchaea* to interact with the MIM2-like motif present in the ESCRT-III-like protein Saci1373 (Samson et al., 2008). The general MIT-MIM contacts range from mostly hydrophobic interactions observed in the VPS4-CHMP1A, Vps4p-Vps2p, VPS4B-CHMP6 and Saci1372 (Vps4-like)-Saci1373 (ESCRT-II-like) complexes (Kieffer et al., 2008; Obita et al., 2007; Samson et al., 2008; Stuchell-Brereton et al., 2007) to a mixture of polar and hydrophobic interactions in case of spastin MIT and CHMP1B (Yang et al., 2008) to mostly polar contacts dominating the AMSH-CHMP3 complex. Thus, the structure of the AMSH-CHMP3 complex extends the diversity of MIT domain interaction surfaces for peptide ligands.

AMSH was reported to interact not only with CHMP3 but also with CHMP1A/B and CHMP2A (Agromayor and Martin-Serrano, 2006). SPR measurements show that both CHMP1A and B interact with low micromolar affinities with AMSH. The low sequence conservation between CHMP3 and CHMP1A/B and the fact that two AMSH mutants that show up to a 130 times lower CHMP3 binding activity still interact with CHMP1B, indicate that CHMP1 and CHMP3 binding sites do not overlap. This is further indirectly supported by the low sequence similarity between AMSH and UBPY, although both bind CHMP1A/B (Agromayor and Martin-Serrano, 2006; Row et al., 2006).

The 60 nM K_d for the CHMP3-AMSH interaction is to date the highest K_d reported for an ESCRT-III MIM-MIT interaction. In contrast spastin-MIT binds to CHMP1A with a K_d of 12 nM K_d (Yang et al., 2008) approximately three times higher than the 30 nM determined for the VPS4-MIT-MIM1 and MIM2 interactions (Kieffer et al., 2008; Obita et al., 2007; Samson et al., 2008; Stuchell-Brereton et al., 2007). The high-affinity interaction between CHMP3 and AMSH is mainly mediated by six salt bridges along the CHMP3 helix compared with two salt bridges in case of the spastin-MIT-CHMP1B interaction. Furthermore the total solvent-accessible surface area buried upon complex formation is 1650 Å² (20 residues) compared with 1946 Å² (24 residues) of the spastin-CHMP1B complex (Yang et al., 2008) and 1238 Å² (15 residues) for the Vps4 MIT-Vps2 complex (Obita et al., 2007). The importance of CHMP3 Arg216, which makes a double-dent salt bridge with AMSH Glu104 and of an intact CHMP3 C terminus, has been documented by mutagenesis

(B) Pull-down of GFP-AMSH(D348A) (lanes 1 and 3) and GFP-AMSH(D348A-H4R14A)-HA (lanes 2 and 4) with GST (lanes 1 and 2) and with GST-CHMP3(151-222) (lanes 3 and 4). The western blot below shows the expression pattern of both GFP-AMSH constructs, and the panel on the side shows the protein input used for the pull-down.

(C) (Left panel) Expression of catalytically inactive AMSH(HH335,337QQ)-HA exerts a mild effect on HIV-1 budding when coexpressed with CHMP3 (lanes 3 and 4). In contrast expression of AMSH(HH335,337QQ)-HA alone or in combination with CHMP3 has no effect on budding (lanes 5 and 6). (Right panel) Western blot revealing the intracellular Gag processing. Only expression of AMSH(HH335,337QQ)-HA and CHMP3 show a defect in intracellular Gag processing (lane 4), while the N-terminal mutant resembles that of AMSH(HH335,337QQ)-HA expression (lane 3) or the vector control (lane 1). (Lower panel) Western blot revealing similar expression levels for the different AMSH constructs.

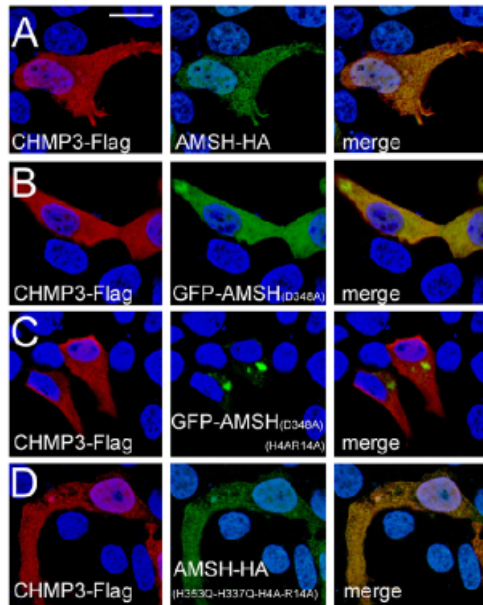


Figure 6. The H4, R14 Mutations in Combination with GFP Alter the Cellular Localization of AMSH when Coexpressed with CHMP3 (A) CHMP3-Flag and AMSH-HA. (B) CHMP3-Flag and catalytically inactive GFP-AMSH(D348A). (C) CHMP3-Flag and catalytically inactive GFP-AMSH(D348A-H4A-R14A). (D) CHMP3-Flag and inactive AMSH-HA carrying the mutations H335Q and H337Q, which render it catalytically inactive as well as the N-terminal mutations H4A and R14A. The scale bar is 10 μ m.

analysis. Notably, deletion of residues 221 and 222 lead to a loss of interaction (Zamborlini et al., 2006) consistent with the structural details revealing that CHMP3 Arg221 forms a salt bridge with AMSH Glu72 and the carboxyl group of the C-terminal CHMP3 Ser222 contacts AMSH Lys107 via a salt bridge. Vice versa we show here that mutagenesis of AMSH residues Lys88, Glu104, and Lys107 abrogates CHMP3 binding in vitro.

In yeast, Doa4 DUB activity has been genetically linked to Snf7 (CHMP4) and Bro1, which leads to endosomal recruitment after ESCRT-III assembly (Luhtala and Odorizzi, 2004) (Amerik et al., 2006). It is thus conceivable that AMSH is also recruited to ESCRT-III polymers assembled on cellular membranes (Saksena et al., 2009; Teis et al., 2008). The helical extension of the MIT domain could then serve as a long arm to position the DUB activity (Sato et al., 2008) >20 nm away from the ESCRT-III polymer (Figure 7), thus reaching into the vesicle formed by ESCRT-I and II (Wollert and Hurley, 2010) for deubiquitination of cargo.

The MIM 1 sequence motif responsible for VPS4 interaction (Stuchell-Brereton et al., 2007) overlaps with the CHMP3-AMSH binding site and superpositioning of the VPS4A-CHMP1B and VPS4B-CHMP2A structures with AMSH-CHMP3 demonstrates the overlap of the binding motifs, which prohibits simulta-

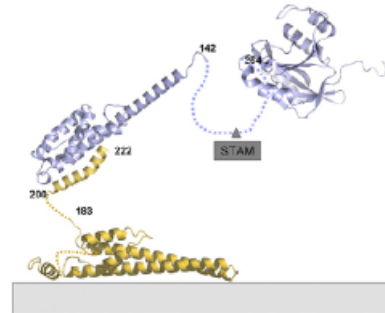


Figure 7. Molecular Model of AMSH in Complex with Membrane-Associated CHMP3

AMSH can be recruited to membranes early in the ESCRT pathway via ESCRT-0 Stam. This might be independent of ESCRT-III CHMP3 interaction or both processes could be linked. If AMSH interacts with activated CHMP3 present in ESCRT-III polymers on membranes, the DUB activity could have an action radius of >20 nm due to the long helical arm of AMSH and the flexible linkage of the CHMP3 MIM to the core of CHMP3-mediated ESCRT-III polymerization.

neous binding of AMSH and VPS4 to CHMP3. Although we do not know the sequence of recruitment, it is most likely that AMSH has to be released from CHMP3 before interacting with VPS4. Since the AMSH interaction is 300-fold tighter than VPS4 binding, a specific mechanism must exist such as potential conformational changes that release AMSH from CHMP3 before it becomes a target for VPS4-driven ESCRT-III disassembly (Babst et al., 1998).

The structure of AMSHDC resembles the structure of the N-terminal domain of USP8/UBPY, a DUB acting in the ESCRT pathway (Avvakumov et al., 2006). This structural similarity is not evident from the low sequence similarity of AMSH and UBPY. One notable structural difference is however the different conformation of a short N-terminal segment that is attached to the core of the monomer in case of AMSHDC and is detached in UBPY-mediated dimerization in the crystal (Avvakumov et al., 2006). N-terminal fusions of catalytically inactive AMSH have been shown previously to exert a dominant-negative effect on HIV-1 and MLV budding (Agromayor and Martin-Serrano, 2006; Zamborlini et al., 2006), which was confirmed by our assay. However, destabilization of the N terminus by structure based mutagenesis led to the loss of the dominant-negative effect indicating that an intact N terminus is important for budding inhibition, which correlated with the ability to interact with CHMP3. Since we observed the dramatic effect of the N-terminal MBP fusion on the oligomerization states of AMSH in vitro we reexamined the role of AMSH in HIV-1 budding by using C-terminal-tagged versions of AMSH. This showed indeed that catalytically inactive AMSH-HA has no effect on HIV-1 budding and only a mild effect upon coexpression with CHMP3, which was abrogated by the AMSH mutations that destabilize helix 1 interaction with the core. We conclude from these results that (1) N-terminal fusions of AMSH change the function of AMSH, which renders it dominant negative in combination with its ESCRT-III binding partner CHMP3. This function requires an

intact N terminus and is disturbed by His4 and Arg14 mutations. (2) Destabilization of the N terminus is not sufficient to induce a strong dominant-negative effect of AMSH-HA, indicating that mutations of His4 and Arg14 interfere with the structural changes required to become dominant negative. In summary we have provided structural principles of a novel MIT-like MIM interaction. The structural and functional analyses demonstrate that conformational plasticity of the N terminus might play an important role in the regulation of AMSH activity. This might entail activation of the catalytic activity by either STAM binding (McCullough et al., 2006) or other regulatory factors.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cloning, Expression, and Purification of AMSH and CHMP3

AMSH containing residues 1–206 (AMSH(1–206)) was expressed and purified as described (Lata et al., 2008a). AMSH(1–206) in complex with full-length CHMP3 (Lata et al., 2008a) was subjected to limited proteolysis with trypsin at a 1:500 (w/w) ratio and bands were separated on a 12% SDS-PAGE. A prominent smaller fragment of AMSH was analyzed by mass fingerprinting and mapped to residues 1–146 (AMSHDC). AMSHDC was cloned into the vector pPROEX HTa (Invitrogen) and into a modified version of the pMalC2G-TEV vector (Bracher and Weissenhorn, 2002) to produce His-tagged AMSHDC and MBP-AMSHDC. CHMP3(183–222) was cloned into the vector pBADM-41 (His-MBP fusion protein with TEV protease cleavage site) to produce His-MBP-CHMP3DN. Full-length AMSH was cloned into pMalC2G-TEV (MBP-AMSH) and tag-less AMSH was cloned into vector pASK-IBA43-plus. CHMP1A (residues 123–196) and CHMP1B (residues 126–199) were cloned into vector pGEX-TEV. His-AMSHDC, MBP-AMSHDC, His-MBP-CHMP3DN, MBP-AMSH, AMSH, GST-CHMP1A, and GST-CHMP1B were expressed in *E. coli* cells BL21 codon⁺ or *E. coli* Rosetta. MBP-AMSH and AMSH expression in *E. coli* was induced at 16 °C overnight. AMSH mutations K88A, E104A and K107A were introduced into His-tagged AMSHDC and GFP-AMSH(D348A) by using standard mutagenesis procedures.

His-AMSHDC was solubilized in buffer A (20 mM Tris [pH 8.5], 100 mM NaCl) and purified on a Ni²⁺-Sephacolumn. His-MBP-CHMP3DN was purified in buffer A on an amylose column, which produced mixtures of His-MBP-CHMP3DN and truncated forms corresponding to free MBP. For ITC and CD analyses, His-MBP-CHMP3DN was further purified by anion exchange chromatography followed gel filtration chromatography on a Superdex-75 (GE Healthcare) column in buffer A. GST-CHMP1A and GST-CHMP1B were purified on a glutathione column in PBS buffer followed by gel filtration chromatography in PBS buffer. His-MBP-CHMP3DN and His-AMSHDC were mixed in a 2:1 molar ratio and the tags were cleaved by TEV protease cleavage at 4 °C. His tags and uncleaved proteins were removed by passing the complex over a Ni²⁺-Sephacolumn in buffer A. A final purification step included a gel filtration on a Superdex-75 column in buffer B (10 mM HEPES [pH 8.0], 100 mM NaCl). The complex was concentrated to 3.3 mg/ml. Selenomethionine substituted His-AMSHDC was produced as described (Doublié, 1997) and the complex with CHMP3DN was purified as described above for the native complex and concentrated to 3.6 mg/ml. MBP-AMSHDC was purified in buffer A on an amylose affinity column in buffer A coupled to a second purification step on a Superdex 75 gel filtration column in buffer A. MBP-AMSH was purified on an amylose column in buffer C (20 mM Tris [pH 8.5], 100 mM NaCl) followed by gel filtration in buffer C. AMSH was purified on a Q-Sepharose column in buffer D (25 mM Tris [pH 8.5], 25 mM NaCl) by applying a NaCl gradient in buffer D. Further purification included a gel filtration on a Superdex 200 column in buffer C. His-tagged AMSHDC mutants were purified as wild-type AMSHDC in buffer A (20 mM Tris [pH 8.5], 100 mM NaCl) on a Ni²⁺-Sephacolumn followed by gel filtration on Superdex-75 in buffer B. The experimental conditions for the pull-downs are described in the Supplemental Experimental Procedures.

Isothermal titration calorimetry and surface plasmon resonance experiments were carried out as described in the Supplemental Experimental Procedures.

Crystallization, Diffraction Data Collection, and Structure Solution of AMSHDC in Complex with CHMP3DN

Initial crystallization conditions for the AMSHDC-CHMP3DN complex at 3.3 mg/ml were determined by using 200 nl sitting drops and 1.9 M sodium malonate as reservoir solution. Crystals were improved by mixing the complex at 7.2 mg/ml with an equal volume of 2.2 M sodium malonate, which resulted in microcrystals. Larger crystals were grown by streak seeding the microcrystals into fresh drops mixed with 1.8 to 2.2 M sodium malonate. Crystals grown in 1.8 M sodium malonate were flash-frozen in liquid nitrogen in the crystallization buffer supplemented with 30% glycerol as cryoprotectant. A native data set was collected at 1.75 Å resolution at the ESRF beam line (Grenoble) ID-14-4. Selenomethionine substituted AMSHDC in complex with CHMP3DN was crystallized as described above for the native complex, except that several rounds of seeding were required to obtain diffraction quality crystals. A single wavelength anomalous dispersion (SAD) data set was collected at 100 K at beam line ID14-4 (ESRF, Grenoble) at the peak wavelength of the selenium K edge (wavelength 0.9795 Å). The data were processed with MOSFLM (Leslie, 1992) and Scala (CCP4, 1994; Evans, 2006). The crystals belong to space group P4₁ with unit cell dimensions of a, b = 45.97 Å, c = 206.91 Å and two complexes per asymmetric unit. Data were initially analyzed using the Auto-Rickshaw platform at EMBL Hamburg (Panjikar et al., 2005). Selenium sites were localized at a resolution of 2.8 Å with the program SHELXD (Schneider and Sheldrick, 2002). The correct hand for the substructure was determined using the programs ABS (Hao, 2004) and SHELXE (Sheldrick, 2002). Initial phases were calculated after density modification using the program SHELXE (Sheldrick, 2002) and model building was performed with the program ARP/wARP (Perrakis et al., 1999). This initial model was used as a search model for molecular replacement with MOLREP (CCP4, 1994) employing the native data to 1.75 Å resolution. Automatic model building was completed with ARP/wARP (Perrakis et al., 1999), manual model building using COOT (Emsley and Cowtan, 2004) and refinement with the program Refmac (Murshudov et al., 1997). The structure contains AMSH residues 2–142 and CHMP3 residues 200 to 222 and was refined to an R factor of 19% and an R_{free} of 23.0%. 99.67% of the residues are within the most favored and allowed regions of a Ramachandran plot (CCP4, 1994). All molecular graphics figures were generated with PYMOL (W. Delano; <http://www.pymol.org/>).

Analysis of Virus Particle Production

293T cells (1.23 × 10⁶) were seeded into T25 flasks and transfected 24 hr later using a calcium phosphate precipitation technique. The cultures were transfected with 1.5 ng HXBH10, which encodes WT HIV-1, together with GFP-AMSH(D348A) (Zamborini et al., 2006) or GFP-AMSH(D348A/H4R14A) and/or pcDNA3.1 vectors expressing CHMP3, AMSH(H_{335,337}QQ)-HA or AMSH(H_{335,337}QQ)-HA harboring the H₄R₁₄A mutations or the appropriate empty vector (0.5 ng each). The total amount of transfected DNA was brought to 8 ng with carrier DNA (pTZ18U). Twenty-four hours after transfection, the cells were lysed in RIPA buffer (140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% SDS), and the culture supernatants were clarified by low-speed centrifugation and passed through 0.45 µm filters. Virions released into the medium were pelleted through 20% sucrose cushions and analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-HIV CA antibody 183-H12-5C (Chesebro et al., 1992). Proteins in the cell lysates were detected by western blotting with anti-HIV CA antibody or rabbit anti-GFP serum (Molecular Probes). The pull-down of GFP-AMSH(D348A) and GFP-AMSH(D348A/H4R14A) employing GST-CHMP3(151–222) was performed as described (Zamborini et al., 2006).

Immunofluorescence Analysis

PcDNA3.1 expression constructs of wild-type AMSH-HA, AMSH(H_{335,337}QQ)-HA carrying the His4 and Arg14 to Ala mutations, CHMP3-Flag and GFP-AMSH(D348A), GFP-AMSH(D348A-H4R14A), GFP-AMSH(D348A-K88A), GFP-AMSH(D348A-E104A), and GFP-AMSH(D348A-K107A) were transfected into 293T cells using standard methods. For indirect immunofluorescence (IF) 293T cells were cultured on coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4 °C. The GFP constructs were directly visualized and for the other constructs coverslips were incubated with anti-HA-tag or anti-Flag-tag antibodies in PBS for 1 hr, at room temperature. Slides were washed three times with PBS, followed by the secondary antibody incubation at room temperature

Structure

Crystal Structure of AMSH-CHMP3



for 1 hr (Alexa488 or 594 coupled anti-mouse or anti-rabbit goat antibodies in PBS). After three washes with PBS, slides were mounted in Mowiol and analyzed by confocal microscopy.

ACCESSION NUMBERS

Coordinates have been deposited in the Protein Data Bank with accession code: 2xze.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures and four figures and can be found with this article online at [doi:10.1016/j.str.2011.05.011](https://doi.org/10.1016/j.str.2011.05.011).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-BLAN-0271-01; W.W.) and the DFG SPP1175 (W.W.), the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (R37AI029873 to H.G.), postdoctoral fellowships from the European Molecular Biology Organization (B.H.), and the Fondation pour la Recherche Médicale (P.M.). We thank N. Miquet for excellent technical assistance and Dr. J. Hurley for providing the CHMP1A cDNA. The HIV-1 p24 monoclonal antibody (183-H12-5C) (provided by Drs. B. Chesebro and K. Wehrly) was obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH.

Received: August 5, 2010

Revised: May 19, 2011

Accepted: May 27, 2011

Published: August 9, 2011

REFERENCES

Agromayor, M., and Martin-Serrano, J. (2006). Interaction of AMSH with ESCRT-III and deubiquitination of endosomal cargo. *J. Biol. Chem.* 281, 23083–23091.

Agromayor, M., Carlton, J.G., Phelan, J.P., Matthews, D.R., Carlin, L.M., Ameer-Beg, S., Bowers, K., and Martin-Serrano, J. (2009). Essential role of hST1 in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 20, 1374–1387.

Alwan, H.A., and van Leeuwen, J.E. (2007). UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation. *J. Biol. Chem.* 282, 1658–1669.

Alwan, H.A., van Zoelen, E.J., and van Leeuwen, J.E. (2003). Ligand-induced lysosomal epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 278, 35781–35790.

Amerik, A.Y., Nowak, J., Swaminathan, S., and Hochstrasser, M. (2000). The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol. Biol. Cell* 11, 3365–3380.

Amerik, A., Sindhi, N., and Hochstrasser, M. (2006). A conserved late endosome-targeting signal required for Doa4 deubiquitinating enzyme function. *J. Cell Biol.* 175, 825–835.

Avvakumov, G.V., Walker, J.R., Xue, S., Finerty, P.J., Jr., Mackenzie, F., Newman, E.M., and Dhe-Paganon, S. (2006). Amino-terminal dimerization, NRDP1-rhodanese interaction, and inhibited catalytic domain conformation of the ubiquitin-specific protease 8 (USP8). *J. Biol. Chem.* 281, 38061–38070.

Babst, M. (2005). A protein's final ESCRT. *Traffic* 6, 2–9.

Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J., and Emr, S.D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* 17, 2982–2993.

Bajorek, M., Schubert, H.L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D.M., Stubblefield, W.M., Uter, N.T., Myszkowski, D.G., Hill, C.P., and Sundquist, W.I. (2009). Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 754–762.

Bieniasz, P.D. (2009). The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe* 5, 550–558.

Bracher, A., and Weissenhorn, W. (2002). Structural basis for the Golgi membrane recruitment of Sly1p by Sed5p. *EMBO J.* 21, 6114–6124.

Carlton, J.G., and Martin-Serrano, J. (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316, 1908–1912.

Carlton, J.G., and Martin-Serrano, J. (2009). The ESCRT machinery: new functions in viral and cellular biology. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 195–199.

CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4). (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, 157–163.

Chesebro, B., Wehrly, K., Nishio, J., and Perryman, S. (1992). Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J. Virol.* 66, 6547–6554.

Dietmann, S., Fernandez-Fuentes, N., and Holm, L. (2002). Automated detection of remote homology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 362–367.

Doublé, S. (1997). Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Methods Enzymol.* 276, 523–530.

Dupré, S., and Hagenauer-Tsapis, R. (2001). Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4482–4494.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.

Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 72–82.

Fabrizant, G., Lata, S., Riches, J.D., Briggs, J.A., Weissenhorn, W., and Kozlov, M.M. (2009). Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000575.

Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pomillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Côté, M., Rich, R.L., et al. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55–65.

Ghazi-Tabatabai, S., Saksena, S., Short, J.M., Pobbati, A.V., Veprintsev, D.B., Crowther, R.A., Emr, S.D., Egelman, E.H., and Williams, R.L. (2008). Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Structure* 16, 1345–1356.

Ghazi-Tabatabai, S., Obita, T., Pobbati, A.V., Perisic, O., Samson, R.Y., Bell, S.D., and Williams, R.L. (2009). Evolution and assembly of ESCRTs. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 151–155.

Göttlinger, H.G., Dorfman, T., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1991). Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3195–3199.

Hanson, P.I., Roth, R., Lin, Y., and Heuser, J.E. (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* 180, 389–402.

Hao, Q. (2004). ABS: a program to determine absolute configuration and evaluate anomalous scatterer substructure. *J. Appl. Crystallogr.* 37, 498–499.

Hartlieb, B., and Weissenhorn, W. (2006). Filovirus assembly and budding. *Virology* 344, 64–70.

Hasdemir, B., Murphy, J.E., Cottrell, G.S., and Bunnett, N.W. (2009). Endosomal deubiquitinating enzymes control ubiquitination and down-regulation of protease-activated receptor 2. *J. Biol. Chem.* 284, 28453–28466.

Hsiop, J.N., Henry, A.G., Marchese, A., and von Zastrow, M. (2009). Ubiquitination regulates proteolytic processing of G protein-coupled receptors after their sorting to lysosomes. *J. Biol. Chem.* 284, 19361–19370.

Hurley, J.H. (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 4–11.

Kieffer, C., Skalicky, J.J., Morita, E., De Domenico, I., Ward, D.M., Kaplan, J., and Sundquist, W.I. (2008). Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Dev. Cell* 15, 62–73.

- Komander, D., Clague, M.J., and Urbé, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 550–563.
- Kyuuma, M., Kikuchi, K., Kojima, K., Sugawara, Y., Sato, M., Mano, N., Goto, J., Takeshita, T., Yamamoto, A., Sugamura, K., and Tanaka, N. (2007). AMSH, an ESCRT-III associated enzyme, deubiquitinates cargo on MVB/late endosomes. *Cell Struct. Funct.* 31, 159–172.
- Lata, S., Roessle, M., Solomons, J., Jamin, M., Gottlinger, H.G., Svergun, D.I., and Weissenhorn, W. (2008a). Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *J. Mol. Biol.* 378, 818–827.
- Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Gottlinger, H.G., and Weissenhorn, W. (2008b). Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science* 321, 1354–1357.
- Leslie, A.G.W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Jnt CCP4/ESF-EACMB Newslett. Protein Crystallogr.* 26.
- Lindås, A.C., Karlsson, E.A., Lindgren, M.T., Ettema, T.J., and Bømdal, R. (2008). A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 18942–18946.
- Luhatalo, N., and Odozetti, G. (2004). Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J. Cell Biol.* 166, 717–729.
- Ma, Y.M., Boucrot, E., Villen, J., Affar, E.B., Gygi, S.P., Gottlinger, H.G., and Kirchhausen, T. (2007). Targeting of AMSH to endosomes is required for EGF receptor degradation. *J. Biol. Chem.* 282, 9805–9812.
- McCullough, J., Clague, M.J., and Urbé, S. (2004). AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J. Cell Biol.* 166, 487–492.
- McCullough, J., Row, P.E., Lorenzo, O., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M.J., and Urbé, S. (2006). Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr. Biol.* 16, 160–165.
- McDonald, B., and Martin-Serrano, J. (2009). No strings attached: the ESCRT machinery in viral budding and cytokinesis. *J. Cell Sci.* 122, 2167–2177.
- Mizuno, E., Iura, T., Mukai, A., Yoshimori, T., Kitamura, N., and Komada, M. (2005). Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Mol. Biol. Cell* 16, 5163–5174.
- Mizuno, E., Kobayashi, K., Yamamoto, A., Kitamura, N., and Komada, M. (2006). A deubiquitinating enzyme UBPY regulates the level of protein ubiquitination on endosomes. *Traffic* 7, 1017–1031.
- Morita, E., and Sundquist, W.I. (2004). Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 395–425.
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.Y., Morham, S.G., Gygi, S.P., Rodesch, C.K., and Sundquist, W.I. (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J.* 26, 4215–4227.
- Mukai, A., Mizuno, E., Kobayashi, K., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kitamura, N., and Komada, M. (2008). Dynamic regulation of ubiquitylation and deubiquitylation at the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Sci.* 121, 1325–1333.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53, 240–255.
- Muzio, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R.B., Zamborini, A., Usami, Y., Gottlinger, H., and Weissenhorn, W. (2006). Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev. Cell* 10, 821–830.
- Nakamura, M., Tanaka, N., Kitamura, N., and Komada, M. (2006). Clathrin anchors deubiquitinating enzymes, AMSH and AMSH-like protein, on early endosomes. *Genes Cells* 11, 593–606.
- Nikko, E., and André, B. (2007). Evidence for a direct role of the Doa4 deubiquitinating enzyme in protein sorting into the MVB pathway. *Traffic* 8, 566–581.
- Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D.J., Perisic, O., Emr, S.D., and Williams, R.L. (2007). Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* 449, 735–739.
- Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V.S., Weiss, M.S., and Tucker, P.A. (2005). Auto-Rickshaw: an automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61, 449–457.
- Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N., and Weissenhorn, W. (2011). Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends Biochem. Sci.* 36, 199–210.
- Perrakis, A., Morris, R., and Lamzin, V.S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* 6, 458–463.
- Pires, R., Hartlieb, B., Signor, L., Schoehn, G., Lata, S., Roessle, M., Moriscot, C., Popov, S., Hinz, A., Jamin, M., et al. (2009). A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure* 17, 843–856.
- Ralborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445–452.
- Reyes-Ibarra, A.P., García-Regalado, A., Ramírez-Rangel, I., Esparza-Silva, A.L., Valadez-Sánchez, M., Vázquez-Prado, J., and Reyes-Cruz, G. (2007). Calcium-sensing receptor endocytosis links extracellular calcium signaling to parathyroid hormone-related peptide secretion via a Rab11a-dependent and AMSH-sensitive mechanism. *Mol. Endocrinol.* 21, 1394–1407.
- Row, P.E., Prior, I.A., McCullough, J., Clague, M.J., and Urbé, S. (2006). The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *J. Biol. Chem.* 281, 12618–12624.
- Saksena, S., Sun, J., Chu, T., and Emr, S.D. (2007). ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* 32, 561–573.
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E., and Emr, S.D. (2009). Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* 136, 97–109.
- Samson, R.Y., Obita, T., Freund, S.M., Williams, R.L., and Bell, S.D. (2008). A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science* 322, 1710–1713.
- Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Oikata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., and Fukui, S. (2008). Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature* 455, 358–362.
- Schneider, T.R., and Sheldrick, G.M. (2002). Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 1772–1779.
- Scott, A., Gaspar, J., Stuchell-Brereton, M.D., Alam, S.L., Skalicky, J.J., and Sundquist, W.I. (2005). Structure and ESCRT-III protein interactions of the MIT domain of human VPS4A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13813–13818.
- Sheldrick, G.M. (2002). Macromolecular phasing with SHELXE. *Z. Kristallogr.* 217, 644–650.
- Shim, S., Kimpler, L.A., and Hanson, P.I. (2007). Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic* 8, 1068–1079.
- Sierra, M.I., Wright, M.H., and Nash, P.D. (2010). AMSH interacts with ESCRT-0 to regulate the stability and trafficking of CXCR4. *J. Biol. Chem.* 285, 13990–14004.
- Stuchell-Brereton, M.D., Skalicky, J.J., Kieffer, C., Karren, M.A., Ghaffarian, S., and Sundquist, W.I. (2007). ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* 449, 740–744.
- Tanaka, N., Kaneko, K., Asao, H., Kasai, H., Endo, Y., Fujita, T., Takeshita, T., and Sugamura, K. (1999). Possible involvement of a novel STAM-associated molecule “AMSH” in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *J. Biol. Chem.* 274, 19129–19135.
- Teis, D., Saksena, S., and Emr, S.D. (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev. Cell* 15, 578–589.
- Tsang, H.T., Connell, J.W., Brown, S.E., Thompson, A., Reid, E., and Sanderson, C.M. (2006). A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics* 88, 333–346.
- Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W., and G. Gottlinger, H. (2009). The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 181–184.

van der Goot, F.G., and Gruenberg, J. (2006). Intra-endosomal membrane traffic. *Trends Cell Biol.* 16, 514–521.

Wollert, T., and Hurley, J.H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464, 864–869.

Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., and Hurley, J.H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458, 172–177.

Yang, D., Rismanchi, N., Renvoisé, B., Lippincott-Schwartz, J., Blackstone, C., and Hurley, J.H. (2008). Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 1278–1286.

Zamborini, A., Usami, Y., Radoshitzky, S.R., Popova, E., Palu, G., and Göttinger, H. (2006). Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 19140–19145.

Publication 2

How to get out : ssRNA envelopped viruses and
membrane fission.

How to get out: ssRNA enveloped viruses and membrane fission

Winfried Weissenhorn¹, Emilie Poudevigne¹, Gregory Effantin¹ and
 Patricia Bassereau²

Enveloped viruses acquire their membrane from the host cell and accordingly need to separate their envelope from cellular membranes via membrane fission. Although some of the enveloped viruses recruit the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) to catalyze the final fission reaction, many enveloped viruses seem to bud in an ESCRT-independent manner. Here we describe the principles that govern membrane fission reactions in general and review progress in the understanding of ESCRT-mediated membrane fission. We relate ESCRT function to budding of single stranded RNA viruses and discuss alternative ways to mediate membrane fission that may govern ESCRT-independent budding.

Addresses

¹Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI), UMI 3265, Université Joseph Fourier-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble Cedex 9, France

²Institut Curie, Centre de Recherche, CNRS UMR 168, Physico-Chimie Curie, Université Pierre et Marie Curie, 75248 Paris, France

Corresponding author: Weissenhorn, Winfried (weissenhorn@embl.fr)

Current Opinion in Virology 2013, 3:159–167

This review comes from a themed issue on Virus structure and function

Edited by Joseph Marcotrigiano and Felix Rey

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 11th April 2013

1879-6257/\$ – see front matter, © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2013.03.011>

Introduction

Enveloped viruses assemble at cellular membranes, which provide the newly formed virus envelope. Viral proteins bend membranes into vesicular structures during assembly and use either their own or cellular host proteins to catalyze membrane fission, an important energetic barrier associated with virion release. The host cell may provide the blueprint for fission, since many membrane trafficking processes require a membrane fission step. Schematically, cellular vesicles have an extracellular, luminal or cytoplasmic content and come in two flavors. First, protein-coated vesicles, such as clathrin-coated endocytotic vesicles [1], COPI-coated or COPII-coated vesicles that bud off Golgi and ER membranes, respectively [2,3] or retromer-coated vesicles in the retrograde pathway [4]. Second, non-coated vesicles such as those retrieving for instance GPI-linked or glycolipid

receptors from the plasma membrane [5] or vesicles that bud into the lumen of endosomes producing multivesicular bodies [6]. Clathrin-coated vesicles recruit helical dynamin polymers at the membrane neck connecting the vesicle and the donor membrane [7,8]. GTP hydrolysis then leads to polymer twisting and neck constriction [9], which sets the stage for membrane fission occurring at the frontier between the narrow dynamin coated membrane and the coexisting bare membrane with a larger diameter. Additionally, fission kinetics is affected by the mechanical properties of the membrane (tension and bending rigidity) [10]. Dynamin has been also implicated in the budding of caveolae [11] and dynamin-like molecules catalyze mitochondrial fission [12]. An alternative model for vesicle fission stipulates that proteins containing amphipathic helices can induce fission by hydrophobic insertion; in the case of N-BAR domain proteins, this effect is modulated, by an antagonistic relationship between these helices and BAR-domain scaffolds [13,14]. In contrast, vesicle budding into the lumen of endosomes is organized by endosomal sorting complexes for transport (ESCRT) [6,15]. Because endosomal vesicle budding is topologically similar to enveloped virus budding, some of the enveloped viruses hijack part of the ESCRT machinery to escape from host cells [16–18]. Here we review membrane fission release of enveloped ssRNA viruses catalyzed by the ESCRT machinery or by ESCRT-independent pathways. In order to place virus release and membrane fission into the context of membrane biophysics, we first summarize general physical principles of membranes favoring fission and relate these principles to ESCRT-dependent and ESCRT-independent budding processes.

Physical properties of membranes influencing fission: phase separation and line tension

In vitro experiments and theoretical approaches have shown that lipid domains in membranes can induce membrane bending and fission from quasi-flat membranes due to the constrictive line tension at the edge of the domains [19,20]. Lateral tension in membranes limits this pinching-off effect, as it favors flat membranes [19]. In the case of tubular geometries reminiscent of the neck of a budding virion, fission also occurs at the edge of domains and can be accelerated by membrane tension [21]. Proteins are in principle not required for this process and the membrane domains can be made of lipids only [22]. However, proteins including actin may contribute to induce phase separation in membranes [23,24] leading to membrane fission [25] and forces generated by actin

polymerization pushing on the membrane can help fission [22]. Although this line-tension fission mechanism has been documented *in vitro* and in some cases *in vivo*, it is not clear to which extent it contributes to *in vivo* membrane fission reactions such as for example ESCRT-driven membrane fission.

Physical modeling of virus budding

Mechanisms for the entry and exit of enveloped virus from cells have been proposed by physicists, in the framework of colloid-membrane interactions. The virus is modeled as a solid particle with a spherical or elongated shape that can be wrapped by the interacting membrane. Theoretical models have been calculated describing the conditions under which particles can spontaneously bud off independently of fission proteins as a function of adhesion energy, particle size and shape or membrane tension. Membrane destabilization leading to fission is expected to occur when wrapping is total. An optimal particle size for budding depending on particle concentration and on the relative densities of interacting molecules on the particle has been derived from these models [26–28]. However, to date numerical simulations are limited to the effect of a single particle and to membranes of small size [29,30].

The ESCRT machinery and budding

The ESCRT machinery is composed of five different complexes, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III and VPS4, which assemble sequentially on the endosomal membrane to concentrate cargo, sort it into vesicles, pinch off the vesicles and recycle ESCRTs [6,15,31,32]. Because ESCRT-III constitutes the membrane fission machinery [33,34], together with VPS4 [6,35] they are also recruited to topologically similar processes such as enveloped virus budding [36] and cytokinesis [37,38].

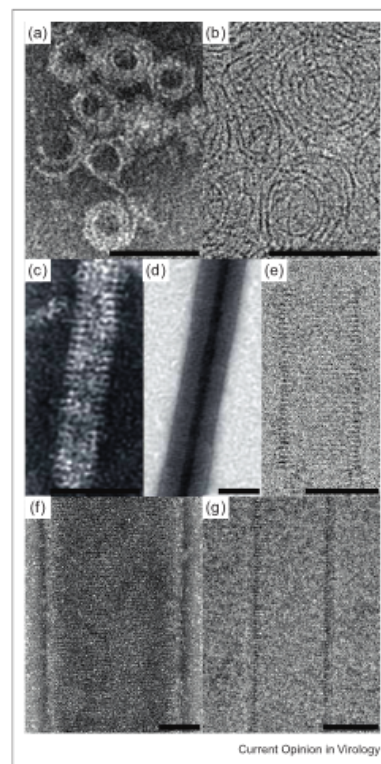
ESCRT-III and membrane fission

Higher eukaryotes express 12 ESCRT-III proteins named CHMP (CHARGed Multivesicular body Protein) and IST1 (Increased Sodium Tolerance 1 gene product) [39–42]. CHMP6 (Vps20), CHMP4 (A, B or C) (snf7), CHMP3 (Vps24) and CHMP2 (A or B) (Vps2) are recruited in this order and may form a core complex in yeast [31], while the remaining ESCRT-III (CHMP1A, B, CHMP5, CHMP7 and IST1) exerts regulatory functions. All ESCRT-III proteins are required for MVB biogenesis [6] and during cell division [43]. In contrast, HIV-1 release requires only one CHMP4 and one CHMP2 family member that act sequentially and may thus constitute the minimal fission machinery [44] together with VPS4 [35,45]. However, CHMP3 exerts a significant synergistic effect on CHMP2A [46] and CHMP1B is recruited last [45,47].

ESCRT-III proteins are small helical assemblies [48–50] and their autoinhibited conformation is controlled by the

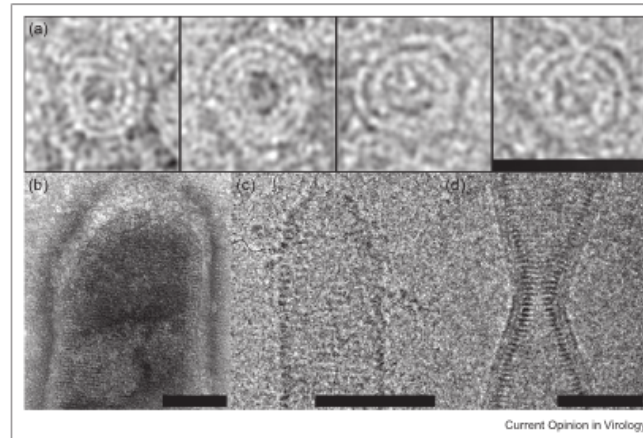
C-terminal region [49,51–53]. Displacement or artificial removal of the C-terminus leads to polymerization *in vitro* and on cellular membranes. Direct ESCRT-III-driven membrane deformation *in vivo* has been only observed twice. Expression of truncated CHMP4 together with dominant negative VPS4 produced membrane tubes that contained helical arrays of presumably CHMP4 [54] and expression of CHMP2B wild type led to the formation of long membrane tubes emanating from the plasma membrane. CHMP2B tube formation required CHMP4 at the base, depended on VPS4 and produced a tight helical layer of CHMP2B filaments spaced by 30 Å [55] similar to the CHMP2A-CHMP3 helical tubes [46] (Figure 1). In

Figure 1



Gallery of ESCRT-III polymers observed *in vitro* and *in vivo*. (a) CHMP2A negative stain. (b) CHMP4 cryo-EM. (c) CHMP1B negative stain. (d) IST1 negative stain. (e) CHMP2A-3 cryo-EM. (f) CHMP2B (with membrane) negative stain. (g) CHMP2B (with membrane) cryo-EM. Scale bars are all 50 nm. Images shown in c and d are reproduced with permission from Bajorek et al. [49].

Figure 2



Gallery of closed coil-like structures, dome-like structures and constricted polymers. (a) Gallery of 4 CHMP2A spirals (negative stain). (b) CHMP2B dome (with membrane) (negative stain). (c) CHMP2A-CHMP3 dome (cryo-EM). (d) CHMP2B membranous bottleneck (cryo-EM). Scale bars are all 50 nm.

vitro, CHMP4B forms loose ~ 30 Å thick helical arrays or ring-like structures [56,57] (Figure 1) and CHMP2A polymerizes into circular ~ 30 Å thick coils [46] (Figure 1). In addition, IST 1 and CHMP1B, tubes have large diameters and yeast Snf7-induced Vps24-Vps2 (CHMP3-CHMP2) polymers resemble their human counterparts [46,49,58[□],59[□]] (Figure 1). However, it should be noted that yeast Vps24 (CHMP3) assembles into two stranded filaments [57] and the spiral ESCRT-III structures imaged at the midbody are much thicker [60] than those shown in Figure 1. In vivo, ESCRT-III and VPS4 have short transient residency times at budding sites [35,45[□],61[□]].

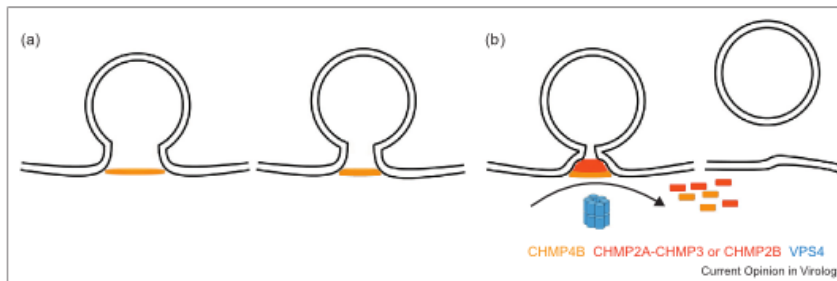
Although circular and tubular structures of ESCRT-III polymers observed in vitro and in vivo can assemble inside a bud neck, their large diameters varying from 50 to > 200 nm impede spontaneous membrane fission. This led to the proposal of two main models. One model suggests that VPS4 induces constriction by filament sliding leading to fission [59[□]], while the second model proposes that ESCRT-III polymers forming a dome-like structure permit neck constriction and membrane fission [18,58[□],62[□]]. Albeit none of the models have been proven experimentally, the dome model is appealing, because all potential polymers implicated in the final cut (CHMP2A-CHMP3 or CHMP2A or CHMP2B) can form dome-like end-caps in vitro or in vivo [46,55,58[□]] (Figure 2). The model predicts that CHMP4 polymers, which may induce a first narrowing of the neck, recruit CHMP2A-CHMP3

or CHMP2A or CHMP2B to build-up a dome-like polymer. The successive narrowing of the helical filament and its affinity for membrane will 'mold' the membrane [63] and induce neck constriction. This could theoretically constrict the neck up to a diameter of 6 nm, which would be energetically favorable for spontaneous fast fission [64[□]] (Figure 3). It is yet unclear how such ESCRT-III assemblies may influence lipid redistribution and fission. Even though ESCRT-III-catalyzed membrane fission in vitro was observed without VPS4 ATPase activity [33[□],34[□]], it is likely that VPS4 plays an active role beyond recycling ESCRT-III [35,45[□],65–67[□]].

A modification of the dome-model proposes the symmetric ring-like arrangement of ESCRT-I-ESCRT-II complexes in the bud neck of intraluminal endosomal vesicles that provide the platform for ESCRT-III filaments projecting into the pore in a whorl-like arrangement that themselves serve as docking site for a dome-like polymer or evolve into a dome-like polymer that executes fission [68,69[□]].

ESCRT-III-induced lipid phase separation may play an additional role [70[□]] thus contributing to constrictive line tension at the edge of membrane domains and permitting spontaneous fission [21[□]]. It is thus possible that the ESCRT-III-dome may function as a scaffold that induces local lipid redistribution and phase separation. As a final touch VPS4 ATP hydrolysis may couple mechanical stress imposed on the membrane with physical properties of

Figure 3



Model for ESCRT-driven membrane fission. In case of HIV-1 CHMP4B (or CHMP4A, to a lesser extent CHMP4C) can be recruited to the budding site via a classical ESCRT-I-ESCRT-II-CHMP6 sequence or directly via Alix or via a yet unknown process. Membrane recruitment will induce CHMP4B filament formation that assembles inside the bud neck; this may induce a first constriction of the neck (a). This first constriction may set the stage for CHMP3-CHMP2A or CHMP2B recruitment, which assemble upon interaction with CHMP4B (b). CHMP2A-CHMP3 or CHMP2B polymers could grow into dome-like structures that attract the neck membrane and constrict it. Upon completion of assembly, VPS4 may start to disassemble the ESCRT-III coat, which may further destabilize the membrane and thus catalyze fission concomitantly with disassembly.

lipid bilayers. Thus the main principles of ESCRT-III-driven membrane fission may be similar to dynamin-catalyzed fission.

Viruses budding with ESCRTs

Hallmarks of ESCRT-dependency of enveloped virus budding are the presence of functional late domains in structural proteins as well as the inhibition of virion release by either dominant negative VPS4, ESCRT-III or Alix [16,17,71,72]. Accordingly, a large number of enveloped RNA viruses employ ESCRTs for their release including all retroviruses [17,36,73,74]. Furthermore most members of the negative strand non-segmented ssRNA viruses recruit ESCRTs for budding from the plasma membrane. This includes Rhabdoviruses [75], Filoviruses [76–78] and most Paramyxoviruses, although some (Nipah, Measles and HRSV) may bud in an ESCRT-independent way [79]. However, no evidence for ESCRTs has yet been reported for Bornaviridae budding. In addition, Arenaviruses, negative strand segmented ssRNA viruses bud ESCRT-dependent [80,81] (Table 1).

Viruses budding without ESCRTs

Orthomyxoviruses (influenza virus), negative-sense segmented ssRNA viruses, bud independently of the ESCRT machinery from the plasma membrane (Table 1) [82]. Influenza virus budding is especially interesting because fission is induced by the viral transmembrane protein M2, which functions otherwise as an ion channel. M2 localizes to the neck of the bud and contains a highly conserved amphipathic helix within its cytoplasmic tail that affects membrane curvature in a cholesterol-dependent way. In fact, the short amphipathic helix sufficed to induce budding from GUVs [83]. The M2 peptide may

destabilize the membrane thereby providing the force for changes in membrane curvature [84]. Thus the function of M2 resembles aspects of fission reactions catalyzed by hydrophobic insertion [13], although M2-driven fission is controlled by the local cholesterol concentration and no protein scaffolds seem to be required.

Although Coronaviridae, positive-strand ssRNA viruses also bud independent of ESCRTs (Table 1), no definite viral or cellular fission factor has yet been described. Coronaviruses obtain their viral envelope containing the glycoprotein S, the major membrane glycoprotein M and a minor membrane protein E by budding through membranes of the ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) [85]. The E protein contains one or two transmembrane regions and was suggested to play a role in membrane bending during assembly and fission [86,87]. However, E may not be essential for MHV (mouse hepatitis virus) and SARS-CoV virion production [88,89]. On the other hand, E-depleted TGEV (transmissible gastroenteritis coronavirus) produces non-infectious immature virions that are stuck in the secretory pathway [90], indicating that the final mechanism still needs to be determined.

Furthermore a number of ssRNA viruses, togaviridae, bunyaviridae and flaviviridae distinguish themselves from other ssRNA viruses by having their glycoproteins organized into protein coats that cover the viral membrane [91,92]. Such coats may drive budding and may contribute to the final membrane fission process by aiding bud neck constriction. Budding may follow physically based budding principles described above, which stipulate that membrane destabilization leading to scission

Table 1

ESCRT-dependent and independent budding of ssRNA enveloped viruses

	Species	Late domain	Virus protein	Cell protein	dn ESCRT
(+) ESCRT^a					
Rhabdoviruses	VSV ^b	PPPY (PSAP)	Matrix M	Nedd4	VPS4
	Rabies virus	PPEY	Matrix M	Nedd4	?
Filoviruses	Ebola virus	PTAP	Matrix VP40	Tsg101	VPS4
		PPEY	Matrix VP40	Nedd4	
	Marburg virus	PPEY	Matrix VP40	Nedd4	VPS4
		PSAP	NP	Tsg101	
Paramyxoviruses	PIV-5 ^c	FPIV	Matrix M	n.d.	VPS4
	Mumps virus	FPIV	Matrix M	n.d.	VPS4, CHMP4B
	Nipah virus	YMYL	Matrix M	n.d.	?, VPS4 independent
	Sendai virus	YLDL	Matrix M	Alix	VPS4?
	Measles virus	?	?	?	VPS4 independent
	HRSV ^d	?	?	?	VPS4 independent
Bornaviruses	Borna virus	?	?	?	?
Arenaviruses	LCMV ^e	PTAP	Matrix Z	Tsg101	?
	Lassa virus	PTAP	Matrix Z	Tsg101	VPS4
	LCMV	PPPY	Matrix Z		?
		PPPY	Matrix Z		
	Mopeia virus	?	Matrix Z (NP?)	Alix	?
(À) ESCRT					
Orthomyxoviruses	Influenza virus				
Coronaviruses	MHV ^f				
	SARS-CoV				
Budding with a protein coat					
Flaviviruses	YFV ^g		NS3	Alix	?
	JEV ^h		NS3	Tsg101	?
	Dengue virus				?
Hepaciviruses	Hepatitis C			HRS, CHMP4B	VPS4, ESCRT-III
	Hepatitis G				
Pestiviruses	Swine fever virus			?	?
Bunyaviruses ⁱ	Hanta virus				
Alphaviruses	SFV ^j			?	?
Rubivirus	Rubella virus			?	?

(+) ESCRT-dependent; (À) ESCRT-independent binding; dn, dominant negative effect of ESCRT expression.

^a The description of late domains and ESCRT dependency of budding has been reviewed previously [75,76,78,79,81,114].^b Vesicular Stomatitis virus.^c Parainfluenza virus.^d Human Respiratory Syncytium virus.^e Lymphocytic Choriomeningitis virus.^f Mouse hepatitis virus.^g Yellow fever virus.^h Japanese encephalitis virus.ⁱ Bunyaviruses are split into five genera, Hantavirus, Nairovirus, Orthobunyavirus, Phlebovirus, Tospovirus.^j Semliki Forest virus.

may occur when the whole viral particle is wrapped by proteins.

Togaviridae, genus alphaviruses (Semliki Forest virus (SFV), Chikungunya, Ross River, and Venezuelan Encephalitis virus) and rubivirus (Rubella virus) are plus sense ssRNA viruses. Rubella virus and alphaviruses anchor their RNA synthesis in membranes of a cell organelle known as the cytopathic vacuole (CPV) that derives from modified endosomes and lysosomes [93,94]. Budding is then organized from the plasma membrane and driven by nucleocapsid-E2 glycoprotein interactions [95], which together with E1 forms a protein shell covering the viral membrane [96,97]. Notably, SFV budding is not affected

by dominant negative VPS4 indicating its independence of the ESCRT machinery [98] (Table 1).

Bunyaviridae (5 genera Hantavirus, Nairovirus, Orthobunyavirus, Phlebovirus, Tospovirus) have segmented, negative-sense ssRNA genomes. The virions bud into the lumen of the Golgi and are released via vesicular transport from the plasma membrane [99] (Table 1). The large cytoplasmic domain of the Gn glycoprotein may act as a surrogate matrix protein of hantaviruses [100,101], while the extracellular glycoproteins assemble into coats composed of tetrameric patches (Hanta virus) [102] or icosahedral lattices (Phlebovirus) [103–105]. Although little is known about virion release, the formation of

the glycoprotein coat may drive budding and release [102].

Flaviviridae, with its genera flavivirus (Dengue virus, yellow fever, west Nile virus, Japanese encephalitis virus), Hepacivirus (Hepatitis C virus (HCV), Hepatitis G virus) and pestivirus (swine fever) contain a positive sense ssRNA genome. HCV buds from endosomal membranes and despite the fact that most non-structural proteins of Flaviviridae have been implicated in virus morphogenesis none of them has an assigned role in membrane fission [106,107]. Immature virions are transported in vesicles from the ER to the Golgi where furin cleavage of prM induces the formation of mature virions, which are released from the plasma membrane via vesicular transport [107]. This latter process depends on ESCRTs [108,109] and dominant-negative VPS4 or ESCRT-III components as well as siRNA knockdowns (Tsg101, Alix, CHMP4B, VPS4) inhibited HCV production (Table 1) [110,111] albeit without affecting the accumulation of intracellular infectious particles [112]. Thus ESCRT-dependency may be required for HCV release via the exosomal secretion pathway [113] restricting the role of ESCRTs to post-budding transport and release steps rather than membrane fission at ER membranes.

Conclusions

Much progress has been made over the last decade to understand how enveloped viruses pinch off from their host cells. In fact much insight into ESCRT function has come from studying enveloped virus budding. Today we know some of the principles that govern ESCRT-III function, but a detailed picture of how it catalyzes fission in conjunction with the ATPase VPS4 is still lacking. The effect of ESCRT-III polymers on lipids and the generation or maintenance of membrane domains is yet unexplored. It is tempting to speculate that some aspects of ESCRT-III-driven fission will resemble those of dynamin-catalyzed fission; these include the role of the helical protein scaffold, although one is assembled on the outside of a membrane neck (dynamin) and the other one on the inside of a membrane neck (ESCRT-III), thus requiring completely different modes of inducing neck narrowing. However, the final constriction may be achieved by using mechanical forces generated either by GTPase (dynamin) or ATPase (VPS4) activities. Furthermore membrane tension and rigidity, which affect the kinetics of dynamin-catalyzed fission, may also play a role during ESCRT-driven fission reactions.

It is yet unclear why some of the enveloped viruses bud independently of ESCRTs. Obviously their genomes would be flexible enough to include short late domain sequences to recruit ESCRTs. In the absence of ESCRTs, one or several factors, viral or yet unknown cellular factors, may set the stage for membrane fission. In

case of influenza virus, the mechanism of hydrophobic insertion by parts of M2 plays a crucial role to deform the membrane neck leading to fission. In a potential third class of viruses such as for example flaviviridae, the formation of a glycoprotein coat may be an important contributor to fission. The glycoprotein network could generate bending forces on the membrane that may lead to bud neck narrowing and eventually fission, which, however, might involve additional cellular or viral factors.

Acknowledgements

Work in the laboratory of the authors is supported by the ANR (Agence Nationale de la Recherche) (W.W.), the FINOVI Foundation (W.W.), the LabEx GRAL (W.W.) and the Institut Curie (P.B.). G.E. is supported by a post doctoral fellowship from the ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales).

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

- McMahon HT, Boucrot E: Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, 12:517-533.
- Popoff V, Adolf F, Brugger B, Wieland F: COP1 budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, 3:a005231.
- Zanetti G, Pahuja KB, Studer S, Shim S, Schekman R: COP1 and the regulation of protein sorting in mammals. *Nat Cell Biol* 2011, 14:20-28.
- Johannes L, Wunder C: Retrograde transport: two (or more) roads diverged in an endosomal tree? *Traffic* 2011, 12:956-962.
- Lundmark R, Carlsson SR: Driving membrane curvature in clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. *Semin Cell Dev Biol* 2010, 21:363-370.
- Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD: The ESCRT pathway. *Dev Cell* 2011, 21:77-91.
- Ferguson SM, De Camilli P: Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012, 13:75-88.
This review provides a detailed molecular description of dynamin-catalyzed fission.
- Schmid SL, Frolov VA: Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011, 27:79-105.
This review provides a detailed molecular description of dynamin-catalyzed fission.
- Roux A, Uyhazi K, Frost A, De Camilli P: GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* 2006, 441:528-531.
- Morlot S, Galli V, Klein M, Chiaruttini N, Manzi J, Humbert F, Dinis L, Lenz M, Cappello G, Roux A: Membrane shape at the edge of the dynamin helix sets location and duration of the fission reaction. *Cell* 2012, 151:619-629.
This paper provides further important mechanistic insights into dynamin-catalyzed fission.
- Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE: Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 1998, 141:101-114.
- Chan DC: Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet* 2012, 46:265-287.
- Boucrot E, Pick A, Camdere G, Liska N, Evergren E, McMahon HT, Kozlov MM: Membrane fission is promoted by insertion of

- amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains. *Cell* 2012, 149:124-136.
This paper describes how amphipathic helices can sculpt membranes and induce fission.
14. Campelo F, Mallotra V: Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Annu Rev Biochem* 2012, 81:407-427.
 15. Hurley JH, Hanson PI: Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, 11:556-566.
 16. Sundquist WJ, Krausslich HG: HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, 2:a006924.
 17. Martin-Serrano J, Neil SJ: Host factors involved in retroviral budding and release. *Nat Rev Microbiol* 2011, 9:519-531.
 18. Peel S, Macheboeuf P, Martinelli N, Weissenhorn W: Divergent pathways lead to ESCRT-III catalyzed membrane fission. *Trends Biochem Sci* 2011, 36:199-210.
 19. Julicher F, Lipowsky R: Domain-induced budding of vesicles. *Phys Rev Lett* 1993, 70:2964-2967.
This paper provides the theoretical basis for the role of membrane domains in fission.
 20. Baumgart T, Hess ST, Webb WW: Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* 2003, 425:821-824.
 21. Allain JM, Storm C, Roux A, Ben Amar M, Joanny JF: Fission of a multiphase membrane tube. *Phys Rev Lett* 2004, 93:158104.
 22. Liu J, Kaksonen M, Drubin DG, Oster G: Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103:10277-10282.
 23. Lingwood D, Ries J, Schwille P, Simons K: Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:10005-10010.
 24. Liu AP, Fletcher DA: Actin polymerization serves as a membrane domain switch in model lipid bilayers. *Biophys J* 2006, 91:4064-4070.
 25. Romer W, Pontani LL, Sorre B, Rentero C, Berland L, Chambon V, Lamaze C, Bassereau P, Sykes C, Gaus K et al.: Actin dynamics drive membrane reorganization and scission in clathrin-independent endocytosis. *Cell* 2010, 140:540-553.
This paper describes the important role of actin in fission reactions.
 26. Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G, Suresh S: Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Adv Mater* 2009, 21:419-424.
 27. van Effenterre D, Roux D: Adhesion of colloids on a cell surface in competition for mobile receptors. *Europhys Lett* 2003, 64:543-549.
 28. Yuan H, Li J, Bao G, Zhang S: Variable nanoparticle-cell adhesion strength regulates cellular uptake. *Phys Rev Lett* 2010, 105:138101.
 29. Noguchi H, Takasu M: Adhesion of nanoparticles to vesicles: a Brownian dynamics simulation. *Biophys J* 2002, 83:299-308.
 30. Cooke IR, Deserno M: Coupling between lipid shape and membrane curvature. *Biophys J* 2006, 91:487-495.
 31. Teis D, Saksena S, Emr SD: Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell* 2008, 15:578-589.
 32. Saksena S, Wahlman J, Teis D, Johnson AE, Emr SD: Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* 2009, 136:97-109.
 33. Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH: Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 2009, 458:172-177.
This paper shows for the first time that ESCRT-III can induce fission in vitro.
 34. Wollert T, Hurley JH: Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 2010, 464:864-869.
 35. Baumgartel V, Ivanchenko S, Dupont A, Sergeev M, Wiseman PW, Krausslich HG, Brauchle C, Muller B, Lamb DC: Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component. *Nat Cell Biol* 2011, 13:469-474.
This paper highlights the dynamics of VPS4 at the HIV-1 budding site and suggests a role for VPS4 in fission.
 36. Morita E, Sundquist WJ: Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004, 20:395-425.
 37. Caballe A, Martin-Serrano J: ESCRT machinery and cytokinesis: the road to daughter cell separation. *Traffic* 2011, 12:1318-1326.
 38. Guizetti J, Gerlich DW: ESCRT-III polymers in membrane neck constriction. *Trends Cell Biol* 2012, 22:133-140.
 39. Bajorek M, Morita E, Skalicky JJ, Morham SG, Babst M, Sundquist WJ: Biochemical analyses of human IST1 and its function in cytokinesis. *Mol Biol Cell* 2009, 20:1360-1373.
 40. Agromayor M, Carlton JG, Phelan JP, Matthews DR, Carlin LM, Ameer-Beg S, Bowers K, Martin-Serrano J: Essential role of hIST1 in cytokinesis. *Mol Biol Cell* 2009, 20:1374-1387.
 41. Dimaano C, Jones CB, Hanono A, Curtiss M, Babst M: Ist1 regulates vps4 localization and assembly. *Mol Biol Cell* 2008, 19:465-474.
 42. Rue SM, Mattei S, Saksena S, Emr SD: Novel Ist1-Did2 complex functions at a late step in multivesicular body sorting. *Mol Biol Cell* 2008, 19:475-484.
 43. Morita E, Colf LA, Karren MA, Sandrin V, Rodesch CK, Sundquist WJ: Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107:12889-12894.
 44. Morita E, Sandrin V, McCullough J, Katsuyama A, Baci Hamilton I, Sundquist WJ: ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe* 2011, 9:235-242.
This paper describes the minimal ESCRT-III fission machinery required for HIV-1 budding.
 45. Jouvenet N, Zhadina M, Bieniasz PD, Simon SM: Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat Cell Biol* 2011, 13:394-401.
This paper describes the sequence of ESCRT recruitment at the HIV-1 budding site.
 46. Effantin G, Dordor A, Sandrin V, Martinelli N, Sundquist WJ, Schoehn G, Weissenhorn W: ESCRT-III CHMP2A and CHMP3 form variable helical polymers in vitro and act synergistically during HIV-1 budding. *Cell Microbiol* 2012, 15:213-226.
 47. Carlson L-A, Hurley JH: In vitro reconstitution of the ordered assembly of the endosomal sorting complex required for transport at membrane-bound HIV-1 Gag clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109:16928-16933.
This paper describes the sequence of HIV-1 Gag induced ESCRT recruitment onto model membranes in vitro.
 48. Muziol T, Pineda-Molina E, Ravelli RB, Zamborlini A, Usami Y, Gottlinger H, Weissenhorn W: Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev Cell* 2006, 10:821-830.
 49. Bajorek M, Schubert HL, McCullough J, Langelier C, Eckert DM, Stubblefield WM, Uter NT, Myszkowski DG, Hill CP, Sundquist WJ: Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat Struct Mol Biol* 2009, 16:754-762.
 50. Xiao J, Chen XW, Davies BA, Saltiel AR, Katzmann DJ, Xu Z: Structural basis of Ist1 function and Ist1-Did2 interaction in the multivesicular body pathway and cytokinesis. *Mol Biol Cell* 2009, 20:3514-3524.
 51. Zamborlini A, Usami Y, Radoshitzky SR, Popova E, Palu G, Gottlinger H: Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103:19140-19145.
 52. Shim S, Kimpler LA, Hanson PI: Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic* 2007, 8:1068-1079.

53. Lata S, Roessle M, Solomons J, Jamin M, Gottlinger HG, Svergun DI, Weissenhorn W: Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *J Mol Biol* 2008, 378:818-827.
54. Hanson PI, Roth R, Lin Y, Heuser JE: Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol* 2008, 180:389-402.
55. Bodon G, Chassefeyre R, Pernet-Gallay K, Martinelli N, Effantin G, Lutje Hulsik D, Belly A, Goldberg Y, Chatellard-Causse C, Blot B et al.: Charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) of the endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane. *J Biol Chem* 2011, 286:40276-40286.
56. Pires R, Hartlieb B, Signor L, Schoehn G, Lata S, Roessle M, Moriscot C, Popov S, Hinz A, Jamin M et al.: A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure* 2009, 17:843-856.
57. Ghazi-Tabatabai S, Sakseena S, Short JM, Pobbati AV, Vepintsev DB, Crowther RA, Emr SD, Egelman EH, Williams RL: Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Structure* 2008, 16:1345-1356.
58. Lata S, Schoehn G, Jain A, Pires R, Pehler J, Gottlinger HG, Weissenhorn W: Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science* 2008, 321:1354-1357.
 This paper reveals the helical tubular architecture ESCRT-III and suggests how such polymer may induce membrane fission upon assembly within the bud neck of a vesicle or virion.
59. Henne WM, Buchkovich NJ, Zhao Y, Emr SD: The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell* 2012, 151:356-371.
 This paper shows that yeast ESCRT-III has a similar helical architecture as mammalian ESCRT-III.
60. Guizetti J, Schermelleh L, Mantler J, Maar S, Poser I, Leonhardt H, Muller-Reichert T, Gerlich DW: Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* 2011, 331:1616-1620.
61. Jouvenet N: Dynamics of ESCRT proteins. *Cell Mol Life Sci* 2012, 69:4121-4133.
62. Lata S, Schoehn G, Solomons J, Pires R, Gottlinger HG, Weissenhorn W: Structure and function of ESCRT-III. *Biochem Soc Trans* 2009, 37:156-160.
63. Lenz M, Crow DJG, Joanny F-F: Membrane buckling induced by curved filaments. *Phys Rev Lett* 2009, 103:038101.
64. Fabrikant G, Lata S, Riches JD, Briggs JA, Weissenhorn W, Kozlov MM: Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput Biol* 2009, 5:e1000575.
 This paper describes the theoretical background how ESCRT-III dome-like structures can induce spontaneous fission.
65. Babst M, Davies BA, Katzmans DJ: Regulation of Vps4 during MVB sorting and cytokinesis. *Traffic* 2011, 12:1298-1305.
66. Elia N, Sougrat R, Spurlin TA, Hurley JH, Lippincott-Schwartz J: Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108:4846-4851.
67. Elia N, Fabrikant G, Kozlov MM, Lippincott-Schwartz J: Computational model of cytokinetic abscission driven by ESCRT-III polymerization and remodeling. *Biophys J* 2012, 102:2309-2320.
68. Boura E, Rozycki B, Chung HS, Herrick DZ, Canagarajah B, Cafiso DS, Eaton WA, Hummer G, Hurley JH: Solution structure of the ESCRT-I and -II supercomplex: implications for membrane budding and scission. *Structure* 2012, 20:874-886.
69. Rozycki B, Boura E, Hurley JH, Hummer G: Membrane-elasticity model of coatless vesicle budding induced by ESCRT complexes. *PLoS Comput Biol* 2012, 8:e1002736.
70. Boura E, Ivanov V, Carlson L-A, Mizuuchi K, Hurley JH: Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) complexes induce phase-separated microdomains in supported lipid bilayers. *J Biol Chem* 2012, 287:28144-28151.
71. Bieniasz PD: The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe* 2009, 5:550-558.
72. Weiss ER, Gottlinger H: The role of cellular factors in promoting HIV budding. *J Mol Biol* 2011, 410:525-533.
73. Freed EO, Mouland AJ: The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology* 2006, 3:77.
74. Bieniasz PD: Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 2006, 344:55-63.
75. Okumura A, Harty RN: Rabies virus assembly and budding. *Adv Virus Res* 2011, 79:23-32.
76. Hartlieb B, Weissenhorn W: Filovirus assembly and budding. *Virology* 2006, 344:64-70.
77. Dolnik O, Kolesnikova L, Becker S: Filoviruses: interactions with the host cell. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65:756-776.
78. Liu Y, Harty RN: Viral and host proteins that modulate filovirus budding. *Future Virol* 2010, 5:481-491.
79. Harrison MS, Sakaguchi T, Schmitt AP: Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *Int J Biochem Cell Biol* 2010, 42:1416-1429.
80. Groseth A, Wolff S, Strecker T, Hoenen T, Becker S: Efficient budding of the tacaribe virus matrix protein z requires the nucleoprotein. *J Virol* 2010, 84:3603-3611.
81. Emonet SE, Urata S, de la Torre JC: Arenavirus reverse genetics: new approaches for the investigation of arenavirus biology and development of antiviral strategies. *Virology* 2011, 411:416-425.
82. Watanabe R, Lamb RA: Influenza virus budding does not require a functional AAA+ ATPase, VPS4. *Virus Res* 2010, 153:58-63.
83. Rossman JS, Jing X, Leser GP, Lamb RA: Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell* 2010, 142:902-913.
 This paper reveals that the amphipathic helix of M2 suffices to induce fission.
84. Rossman JS, Lamb RA: Influenza virus assembly and budding. *Virology* 2011, 411:229-236.
85. Ruch TR, Machamer CE: The coronavirus E protein: assembly and beyond. *Viruses* 2012, 4:363-382.
86. Raamsman MJ, Locker JK, de Hooge A, de Vries AA, Griffiths G, Vennema H, Rottier PJ: Characterization of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E. *J Virol* 2000, 74:2333-2342.
87. Arbely E, Khattari Z, Brotons G, Akkawi M, Salditt T, Arkin IT: A highly unusual palindromic transmembrane helical hairpin formed by SARS coronavirus E protein. *J Mol Biol* 2004, 341:769-779.
88. Kuo L, Masters PS: The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J Virol* 2003, 77:4597-4608.
89. DeDiego ML, Alvarez E, Almazan F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, Shieh WJ, Zaki SR, Subbarao K, Enjuanes L: A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol* 2007, 81:1701-1713.
90. Ortego J, Ceriani JE, Patino C, Plana J, Enjuanes L: Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. *Virology* 2007, 368:296-308.
91. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG: A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 2005, 3:13-22.
92. Vaney MC, Rey FA: Class II enveloped viruses. *Cell Microbiol* 2011, 13:1451-1459.
93. Fontana J, Tzeng WP, Calderita G, Fraile-Ramos A, Frey TK, Risco C: Novel replication complex architecture in rubella replicon-transfected cells. *Cell Microbiol* 2007, 9:875-890.

94. Kujala P, Ikaheimonen A, Ehsani N, Vihinen H, Auvinen P, Kaariainen L: Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *J Virol* 2001, 75:3873-3884.
95. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ: A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol* 2009, 4:837-856.
96. Lescar J, Roussel A, Wien MW, Navaza J, Fuller SD, Wengler G, Rey FA: The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* 2001, 105:137-148.
97. Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vornrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E, Thompson A, Bricogne G, Rey FA: Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 2010, 468:709-712.
98. Taylor GM, Hanson PI, Kielian M: Ubiquitin depletion and dominant-negative VPS4 inhibit rhabdovirus budding without affecting alphavirus budding. *J Virol* 2007, 81:13631-13639.
99. Fontana J, Lopez-Montero N, Elliott RM, Fernandez JJ, Risco C: The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell Microbiol* 2008, 10:2012-2028.
100. Hepojoki J, Strandin T, Wang H, Vapalahti O, Vaheri A, Lankinen H: Cytoplasmic tails of hantavirus glycoproteins interact with the nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 2010, 91:2341-2350.
101. Strandin T, Hepojoki J, Wang H, Vaheri A, Lankinen H: The cytoplasmic tail of hantavirus Gn glycoprotein interacts with RNA. *Virology* 2011, 418:12-20.
102. Huiskonen JT, Hepojoki J, Laurinmaki P, Vaheri A, Lankinen H, Butcher SJ, Grunewald K: Electron cryotomography of Tula hantavirus suggests a unique assembly paradigm for enveloped viruses. *J Virol* 2010, 84:4889-4897.
103. Overby AK, Pettersson RF, Grunewald K, Huiskonen JT: Insights into bunyavirus architecture from electron cryotomography of Uukuniemi virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:2375-2379.
104. Freiberg AN, Sherman MB, Morais MC, Holbrook MR, Watowich SJ: Three-dimensional organization of Rift Valley fever virus revealed by cryoelectron tomography. *J Virol* 2008, 82:10341-10348.
105. Huiskonen JT, Overby AK, Weber F, Grunewald K: Electron cryo-microscopy and single-particle averaging of Rift Valley fever virus: evidence for GN-GC glycoprotein heterodimers. *J Virol* 2009, 83:3762-3769.
106. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, Andre P: Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 2011, 19:95-103.
107. Murray CL, Jones CT, Rice CM: Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2008, 6:699-708.
108. Carpp LN, Galler R, Bonaldo MC: Interaction between the yellow fever virus nonstructural protein NS3 and the host protein Alix contributes to the release of infectious particles. *Microbes Infect* 2011, 13:85-95.
109. Chiou CT, Hu CC, Chen PH, Liao CL, Lin YL, Wang JJ: Association of Japanese encephalitis virus NS3 protein with microtubules and tumour susceptibility gene 101 (TSG101) protein. *J Gen Virol* 2003, 84:2795-2805.
110. Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N: The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PLoS ONE* 2011, 6:e14517.
111. Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnoglik SL, Wakita T, Hotta H: Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. *Microbes Infect* 2012, 14:69-78.
112. Corless L, Crump CM, Griffin SD, Harris M: Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles. *J Gen Virol* 2010, 91:362-372.
113. Tamai K, Shiina M, Tanaka N, Nakano T, Yamamoto A, Kondo Y, Kakazu E, Inoue J, Fukushima K, Sano K et al.: Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. *Virology* 2012, 422:377-385.
114. Chen BJ, Lamb RA: Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT? *Virology* 2008, 372:221-232.

Résumés

La voie endo-lysosomale dirige les récepteurs membranaires vers le processus de dégradation lysosomale. En bref, les récepteurs sont marqués par l'ubiquitine, envoyés vers les endosomes précoces puis, pris en charge par le système ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) et intégrés dans des vésicules intraluminales. Ce système est composé des complexes ESCRT-0, I, II, III et VPS4. Certaines protéines ESCRT sont aussi recrutées lors de processus topologiquement similaires comme la cytokinèse ou le bourgeonnement viral de certains virus enveloppés. AMSH (Associated Molecule of the SH3 domain of STAM) est une ubiquitine-hydrolase associée au système ESCRT qui hydrolyse les chaînes d'ubiquitine liées par leur lysine K63. Elle interagit directement avec ESCRT-0 via la sous-unité STAM et avec les membres CHMP1A, 1B et 3 d'ESCRT-III. Bien qu'AMSH pourrait recruter ces protéines ESCRT ou être elle-même recrutée par celles-ci, le mécanisme d'activation de son activité d'hydrolase est encore méconnu. Afin de mieux comprendre les bases structurales de l'activation d'AMSH, j'ai essayé d'analyser des formes recombinantes de cette protéine par cristallographie aux rayons X et par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ce qui m'a permis d'obtenir deux modèles à basse résolution. De plus, j'ai caractérisé par SPR (Surface Plasmon Resonance) les interactions entre AMSH et CHMP1A, 1B et 3 et déterminé les résidus clefs du dernier complexe. Cela a montré que les surfaces d'interaction employées par le domaine MIT d'AMSH ne sont pas les mêmes pour CHMP3 et CHMP1A/1B. J'ai aussi découvert que l'activité enzymatique d'AMSH seule est très faible ce qui impliquerait une auto-inhibition en solution. L'hydrolyse des chaînes d'ubiquitine liées par leur lysine K63 pourrait alors être activée par une construction de STAM comprenant le domaine SH3 ainsi que les domaines liant l'ubiquitine VHS et/ou UIM.

The endosomal pathway targets plasma membrane receptors for lysosomal degradation. Briefly, receptors are tagged by an ubiquitin, delivered to the early endosome and sorted into intraluminal vesicles by the ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) machinery, composed of ESCRT-0, -I, -II, -III and the VPS4 complex. Some ESCRTs are also recruited during topologically similar processes such as cytokinesis and budding of some enveloped viruses. AMSH (Associated Molecule of the SH3 domain of STAM) is an ESCRT associated ubiquitin-hydrolase which hydrolyses K63-linked ubiquitin chains. AMSH interacts directly with the ESCRT-0 subunit STAM and ESCRT-III members CHMP1A, CHMP1B and CHMP3. Although AMSH may either recruit these ESCRTs or be maybe recruited by these ESCRTs, little is known about the activation mechanism of its hydrolase activity. In order to understand the structural basis for AMSH activation I attempted to analyze recombinant forms of AMSH by X-ray crystallography and SAXS, which produced low resolution models of AMSH. I further characterized AMSH interactions with CHMP1A, CHMP1B and CHMP3 by SPR and determined the key residues for interaction. This showed that the AMSH MIT domain employs two different surfaces for CHMP3 and CHMP1A/B interactions. I also found that recombinant AMSH has very poor enzymatic activity on its own, which indicates an auto-inhibited state in solution. K63-linked ubiquitin hydrolysis could be activated by STAM constructs containing the SH3 and ubiquitin binding domains (UIM and/or VHS), which were shown to interact directly with AMSH via SPR. Thus activation of the hydrolase activity by STAM corroborates indirectly the autoinhibited native state.